

From the INTERNATIONAL BUREAU

## PCT

### NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 17 April 2000 (17.04.00)	
<b>International application No.</b> PCT/DE99/02865	<b>Applicant's or agent's file reference</b> km-1-pct
<b>International filing date (day/month/year)</b> 06 September 1999 (06.09.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 19 September 1998 (19.09.98)
<b>Applicant</b> KRAMER, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
06 March 2000 (06.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b> <p style="text-align: center;">Antonia Muller</p> Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 7 :</b>  C12N 15/12, 15/11, 15/85, 5/10, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/17, 39/395, G01N 33/53	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/17232</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. März 2000 (30.03.00)
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/02865  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 6. September 1999 (06.09.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b>          198 42 863.4      19. September 1998 (19.09.98)    DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> ✓ KRAMER, Michael [DE/DE];          Bergstrasse 85, D-64319 Pfungstadt (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ✓ BECHTEL, Michael [DE/DE]; Edelsteinstrasse, D-69198 Schriesheim (DE).          ✓ REINARTZ, Jeanette [DE/DE]; Angelweg 2, D-69121 Heidelberg (DE).          ✓ SCHÄFER, Birgit [DE/DE]; Odenwaldstrasse 49/2, D-69124 Heidelberg (DE).          ✓ WALLICH, Reinhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 52/1, D-69118 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).       </div> <div style="width: 48%; vertical-align: top;"> <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).   <b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>   <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 12. Oktober 2000 (12.10.00)       </div> </div>		
<b>(54) Title:</b> REGULATORY PROTEIN FROM HUMAN KERATINOCYTES ✓  <b>(54) Bezeichnung:</b> REGULATORISCHES PROTEIN AUS HUMANEN KERATINOZYTEN  <b>(57) Abstract</b>  <p>The invention relates to an isolated polypeptide which is equivalent to or similar (i.e., equivalent in function and effect) to a protein which is naturally occurring in human keratinocytes and which is increasingly expressed in the activated state of the keratinocytes. The invention also relates to an isolated nucleic acid encoding such a polypeptide or protein typical of human keratinocytes, as well as to the use of said polypeptide and said nucleic acid for the purpose of assays, particularly for diagnostic purposes, and/or for therapeutic purposes, or to the use of reagents, particularly of recombinant vector molecules and antibodies directed against such molecules. The inventive protein has an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 of the sequence listing or an allele or derivative of said amino acid sequence derived by amino acid substitution, deletion, insertion or inversion. The inventive nucleic acid has a nucleotide sequence as depicted in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4 of the sequence listing or a nucleotide sequence complementary thereto or a partial sequence of one of these nucleotide sequences or a nucleotide sequence which fully or partially hybridizes to any of the above-mentioned nucleotide sequences.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b>  <p>Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinanten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle. Das erfindungsgemäße Protein weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:3 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz auf, und die erfindungsgemäße Nukleinsäure weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer der vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisierenden Nukleotidsequenz auf.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/11 C12N15/85 C12N5/10 C07K14/47  
C07K16/18 A61K38/17 A61K39/395 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>JAEGER, C.: "Identification of a novel transmembrane-protein (pKe#192/MAP17) expressed by human keratinocytes in the upper stratum granulosum of the epidermis" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 112, no. 4, April 1999 (1999-04), page 574 XP000909987 the whole document</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-11, 13, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2000

Date of mailing of the international search report

10.02.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal. Publication No  
PCT/DE 99/02865

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUIZ, J.C. ET AL.: "Identification of novel protein kinases expressed in the myocardium of the developing mouse heart" MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 48, no. 3, 1994, pages 153-164, XP000909836 the whole document & EMBL DATABASE; EMROD.MM11494; ACCESSION-NO.: U11494, 12 December 1994 (1994-12-12), the whole document	1-7,12, 13,15,19
A	--- KOMINE, M. ET AL.: "The activated keratinocytes" ACTA DERMATOVENEROLOGICA A.P.A., vol. 4, no. 4, 1995, pages 169-173, XP000915531 the whole document	
A	--- JIANG, C.-K., ET AL.: "Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16" PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 90, no. 14, 1993, pages 6786-6790, XP000910179 the whole document	
A	--- KNAPP, B. ET AL.: "Three cDNA sequences of mouse type I keratins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 262, no. 2, 1987, pages 938-945, XP000910011 the whole document -----	

2

3

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/11 C12N15/85 C12N5/10 C07K14/47  
C07K16/18 A61K38/17 A61K39/395 G01N33/53

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>JAEGER, C.: "Identification of a novel transmembrane-protein (pKe#192/MAP17) expressed by human keratinocytes in the upper stratum granulosum of the epidermis" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Bd. 112, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seite 574 XP000909987 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-11, 13, 15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10. 07. 00

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Donath, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intr. des Aktenzeichens  
PCT, 99/02865

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>RUIZ, J.C. ET AL.: "Identification of novel protein kinases expressed in the myocardium of the developing mouse heart" MECHANISMS OF DEVELOPMENT, Bd. 48, Nr. 3, 1994, Seiten 153-164, XP000909836 das ganze Dokument &amp; EMBL DATABASE; EMROD.MM11494; ACCESSION-NO.: U11494, 12. Dezember 1994 (1994-12-12), das ganze Dokument</p>	1-7,12, 13,15,19
A	<p>----- KOMINE, M. ET AL.: "The activated keratinocytes" ACTA DERMATOVENEROLOGICA A.P.A., Bd. 4, Nr. 4, 1995, Seiten 169-173, XP000915531 das ganze Dokument</p>	
A	<p>----- JIANG, C.-K., ET AL.: "Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16" PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Bd. 90, Nr. 14, 1993, Seiten 6786-6790, XP000910179 das ganze Dokument</p>	
A	<p>----- KNAPP, B. ET AL.: "Three cDNA sequences of mouse type I keratins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 2, 1987, Seiten 938-945, XP000910011 das ganze Dokument -----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE99/02865

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claims 16 and 18 relate to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl die Ansprüche 16 und 18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

09 P787559  
**Translation**

## PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

9  
**RECEIVED**

JAN 07 2002

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference km-1-pct	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/02865	International filing date (day/month/year) 06 September 1999 (06.09.99)	Priority date (day/month/year) 19 September 1998 (19.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/00		
Applicant KRAMER, Michael		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 March 2000 (06.03.00)	Date of completion of this report 06 March 2001 (06.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/02865

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-24 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_ 1-19 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1-15 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/02865

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	9-17, 19	YES
	Claims	1-8, 18	NO
Inventive step (IS)	Claims	10, 11, 16, 17	YES
	Claims	1-9, 12-15, 18, 19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

1. The report makes reference to the following document:

D1: Mechanisms of Development 48, 153-164, 1994

2. The present international application relates to an isolated polypeptide equivalent (i.e. in function and effect) or similar to a protein that occurs naturally in human keratinocytes and whose expression is increased when the keratinocytes are in an activated state. In addition, the present international application relates to a nucleic acid coding for such a polypeptide typical for human keratinocytes, to the use of this polypeptide, its specific antibodies and to DNA for diagnostic and/or therapeutic purposes.

Only Claims 9-17 and 19 of the present international application can be considered novel over the international search report citations (PCT Article 33(2)).

- 2.1 D1 describes the identification and isolation of a protein kinase (msk) expressed only in the cells of the myocardium, and the msk cDNA which codes

therefor. The msk protein kinase belongs to the family of serine/threonine protein kinases and has a specific homology to the SNF1 sequences of yeast. The msk protein sequence is, for example, in 818 AA up to 78.4% identical with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3 and in 2426 bp up to 76.5% identical with the nucleotide sequence SEQ ID NO: 4 shown in the present international application (see D1, p. 153 'Abstract', pp. 162-163, 'Experimental procedures', Fig. 2, 4).

The protein described in D1 is therefore an allele or a derivative which could have been produced from the amino acid sequence shown in the sequence protocol SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3 by amino acid substitution, deletion, insertion or inversion. The DNA coding for the msk protein has, in addition, partial sequences which correspond to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4 and hybridises fully or in part with one of these aforementioned nucleotide sequences.

The above document is therefore prejudicial to the novelty of Claims 1-8 and 18.

3. Document D1 is consulted as the closest prior art in assessing the inventive step of Claims 9-17 and 19 of the present international application.

- 3.1 Dependent Claim 9 and use Claims 12 and 19 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of the claims to which they refer, contain an inventive step, since these additional features and the use of the nucleic acid/polypeptide are well-known techniques and applications in the field of molecular biology.

Furthermore, an inventive step cannot be acknowledged for the use of an already known polypeptide for producing an antibody and the subsequent general use of such an antibody in diagnosis or therapy.

The subject matter of Claims 9, 12-15 and 19 does not therefore involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

- 3.2 The subject matter of Claims 10 and 11 relates to a transformed host cell able to express a protein that occurs in human keratinocytes and whose expression is increased in activated keratinocytes. The subject matter of Claims 16 and 17 relates to a reagent for the indirect detection of a protein that occurs in human keratinocytes and whose expression is increased in activated keratinocytes, and to the use of an antibody directed against such a protein in the diagnostic and/or therapeutic treatment of skin diseases. Since the closest prior art contains no suggestions whatsoever as to a protein that occurs in human keratinocytes and whose expression is increased in activated keratinocytes, Claims 10, 11, 16 and 17 of the present international application involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1 and 2 lack clarity due to the phrase "that is **equivalent or similar** to a protein whose expression is increased". This phrase is quite meaningless unless the meaning of 'equivalent or similar proteins' is clarified. Does this mean proteins which have approximately the same molecular weight or those which have an identical biological function?
2. Claims 2 and 5-7 lack clarity due to the phrases "hybridising nucleotide sequence" and "with which ... is hybridised". Since no technical information whatsoever is given with respect to the hybridisation conditions, these claims are thoroughly imprecise and vague.
3. Claims 8, 10 and 17 lack clarity. The arbitrary internal designation of a protein (pKe#122) used in these claims is meaningless to a person skilled in the art and does not constitute a definition based on technical features.
4. It is drawn to the applicant's attention that the words "preferably" and "in particular" used in Claims 5, 8, 10, 12, 14 and 17-19 do not restrict the scope of protection sought by the claims, that is, the feature following these words is considered to be entirely optional.
5. It is drawn to the applicant's attention that Claim 12 also includes using a nucleic acid to produce

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 99/02865

## VIII. Certain observations on the international application

**transgenic human beings.** If a European application were submitted, this claim would not be allowable since its subject matter is unethical and therefore non-patentable.



30  
T  
091787559  
VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 09 MAR 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts km-1-pct	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02865	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 06/09/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/09/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/00		
Anmelder KRAMER, Michael		



RECEIVED  
JAN 6 7 2002  
TECH CENTER 1600/2900

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  06/03/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  06.03.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Donath, C  Tel. Nr. +49 89 2399 8710  

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-24                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-19                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1-15                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-9, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

RECEIVED  
JAN 07 2002  
TECH CENTER 1600/2900

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	9-17,19
	Nein: Ansprüche	1-8,18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	10,11,16,17
	Nein: Ansprüche	1-9,12-15,18,19
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-19
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**Ad section V.:**

1. Auf das folgende Dokument wird in diesem Bescheid Bezug genommen:

D1 Mechanisms of Development 48, 153-164, 1994

2. Die vorliegende Internationale Anmeldung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Desweiteren betrifft die vorliegende Internationale Anmeldung eine Nukleinsäure, die für ein solches, für humane Keratinozyten typisches Polypeptid, kodiert, die Verwendung dieses Polypeptids, dessen spezifische Antikörper, sowie der DNA für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke.

Im Hinblick auf die im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente können nur die Ansprüche 9 - 17 und 19 der vorliegenden Internationalen Anmeldung als neu betrachtet werden (Artikel 33(2) PCT).

- 2.1 D1 beschreibt die Identifizierung und Isolierung einer Protein Kinase (msk), die nur in den Zellen des Myokardiums exprimiert wird, sowie der dafür kodierenden msk cDNA. Die msk Protein Kinase gehört zu der Familie der Serin/Threonin Protein Kinasen und weist eine signifikante Homologie zu den SNF1 Sequenzen aus Hefe auf. Die msk Proteinsequenz ist z.B. in 818 AA zu 78.4% identisch mit der in SEQ ID NO:3 gezeigten Aminosäuresequenz und in 2426 bp zu 76.5% identisch mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Nukleotidsequenz der vorliegenden Internationalen Anmeldung (S.D1, S.153, 'Abstract', S.162-163, 'Experimental procedures', Fig.2,4).

Das in D1 beschriebene Protein stellt somit ein Allel oder Derivat dar, welches durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, oder -inversion aus der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz entstanden sein könnte; die für das msk Protein kodierende DNA weist zudem Teilsequenzen auf, die der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:4 dargestellten Nukleotidsequenz entsprechen und ganz oder teilweise mit einer dieser vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisiert.

Das obige Dokument ist daher neuheitsschädlich für den Gegenstand der Ansprüche 1-8 und 18.

3. Zur Beurteilung eines erfinderischen Schrittes der Ansprüche 9 - 17 und 19 der vorliegenden Internationalen Anmeldung wird Dokument D1 als der nächstliegende Stand der Technik herangezogen.
- 3.1 Der abhängige Anspruch 9 sowie die Verwendungsansprüche 12 und 19 scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, welche in Kombination mit den Merkmalen der Ansprüche auf die sie sich beziehen, einen erfinderischen Schritt beinhalten, da diese zusätzlichen Merkmale bzw. die Verwendung der/s Nukleinsäure/Polypeptids wohlbekannte Techniken und Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Molekular Biologie darstellen.

Darüber hinaus kann für die Verwendung eines bereits bekannten Polypeptids zur Herstellung eines Antikörpers sowie zur anschließenden allgemeinen Verwendung eines solchen Antikörpers in der Diagnose oder Therapie ein erfinderischer Schritt nicht anerkannt werden.

Der Gegenstand der Ansprüche 9, 12-15 und 19 beruht daher nicht auf einer nach Artikel 33(3) PCT erforderlichen erfinderischen Tätigkeit.

- 3.2 Der Gegenstand der Ansprüche 10 und 11 betrifft eine transformierte Wirtszelle, die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins aufweist. Der Gegenstand der Ansprüche 16 und 17 betrifft ein Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins sowie die Verwendung eines gegen ein solches Protein gerichteten Antikörpers zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen. Da der nächstliegende Stand der Technik keinerlei Hinweise auf ein in humanen Keratinozyten vorkommendes und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins enthält, ist für die Ansprüche 10, 11, 16 und 17 der vorliegenden Internationalen Anmeldung eine erfinderische Tätigkeit anzuerkennen (Artikel 33(3) PCT).

**Ad section VIII.:**

1. Ansprüche 1 und 2 mangelt es an Klarheit , auf Grund des Ausdrucks "...das einem... verstärkt exprimierten Protein **gleich oder ähnlich** ist". Dieser Ausdruck ist absolut nichtsagend, sofern nicht geklärt ist, was unter gleichen oder ähnlichen Proteinen zu verstehen ist; sind damit Proteine gemeint, die annähernd das gleiche Molekulargewicht aufweisen oder solche deren biologische Funktionen identisch sind?
2. Ansprüche 2 und 5-7 mangelt es an Klarheit auf Grund der Ausdrücke "hybridisierende Nukleotidsequenz" und "...mit der... hybridisiert". Da keinerlei technische Informationen über die Hybridisierungsbedingungen enthalten sind, sind diese Ausdrücke völlig ungenau und vage.
3. Den Ansprüchen 8, 10 und 17 mangelt es an Klarheit. Die in diesen Ansprüchen verwendete interne willkürliche Bezeichnung eines Proteins (pKe#122) ist für den Fachmann bedeutungslos und stellt keine Definition durch technische Merkmale dar.
4. Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß die in Ansprüchen 5, 8, 10, 12, 14 und 17-19 verwendeten Ausdrücke "vorzugsweise" oder "insbesondere" keine Beschränkung des Schutzzumfangs der Patentansprüche bewirken, d.h. das nach einem derartigen Ausdruck stehende Merkmal ist als ganz und gar fakultativ zu betrachten.
5. Der Anmelder wird darauf hingewiesen, das Anspruch 12 die Verwendung einer Nukleinsäure zur Herstellung **transgener Menschen** mit umfaßt. Im Falle einer Europäischen Anmeldung ist dieser Anspruch nicht gewährbar, da der Gegenstand dieses Anspruchs gegen die öffentliche Ordnung und die guten Sitten verstößt, und damit eigens von der Patentierbarkeit ausgeschlossen ist.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>km-1-pct</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 99/ 02865</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>06/09/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>19/09/1998</b>
Anmelder <b>KRAMER, Michael</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
  
Obwohl die Ansprüche 16 und 18 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/11 C12N15/85 C12N5/10 C07K14/47  
C07K16/18 A61K38/17 A61K39/395 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>JAEGER, C.: "Identification of a novel transmembrane-protein (pKe#192/MAP17) expressed by human keratinocytes in the upper stratum granulosum of the epidermis" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Bd. 112, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seite 574 XP000909987 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-11,13, 15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. 07. 00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Donath, C

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICHE ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>RUIZ, J.C. ET AL.: "Identification of novel protein kinases expressed in the myocardium of the developing mouse heart" MECHANISMS OF DEVELOPMENT, Bd. 48, Nr. 3, 1994, Seiten 153-164, XP000909836 das ganze Dokument &amp; EMBL DATABASE; EMROD.MM11494; ACCESSION-NO.: U11494, 12. Dezember 1994 (1994-12-12), das ganze Dokument</p>	1-7,12, 13,15,19
A	<p>-----</p> <p>KOMINE, M. ET AL.: "The activated keratinocytes" ACTA DERMATOVENEROLOGICA A.P.A., Bd. 4, Nr. 4, 1995, Seiten 169-173, XP000915531 das ganze Dokument</p>	
A	<p>-----</p> <p>JIANG, C.-K., ET AL.: "Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16" PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Bd. 90, Nr. 14, 1993, Seiten 6786-6790, XP000910179 das ganze Dokument</p>	
A	<p>-----</p> <p>KNAPP, B. ET AL.: "Three cDNA sequences of mouse type I keratins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 2, 1987, Seiten 938-945, XP000910011 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

RUDOLPH, Ulrike  
In Der Schanz 10  
D-69198 Schriesheim  
ALLEMAGNE

PCT

SCHRIFTLICHER BESCHEID  
(Regel 66 PCT)

*Beigang 25.10.00*

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

km-1-pct

Absenddatum  
(Tag/Monat/Jahr)

20.10.2000

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von 2 Monat(en)  
ab obigem Absenddatum

*20.12.0*

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE99/02865

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

06/09/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

19/09/1998

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK

C07K14/00

Anmelder

KRAMER, Michael

- Dieser Bescheid ist der erste schriftliche Bescheid der mit der Internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde
- Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheides
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(II) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

- Der Anmelder wird aufgefordert, zu diesem Bescheid Stellung zu nehmen

Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).

Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.8 und 66.9.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4. Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis. Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.6.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

- Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 19/01/2001.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde:

 Europäisches Patentamt  
D-80296 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer

Donath, C

Formalsachbearbeiter (einschl. Fristverlängerung)

Vullo, C

Tel. +49 89 2399 8061



**SCHRIFTLICHER BESCHEID**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02865

**I. Grundlage des Bescheids**

1. Dieser Bescheid wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht"*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-24 ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-19 ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1-15 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:  
☐ Ansprüche, Nr.:  
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bescheid ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

**V. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung****1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ansprüche	1-8,18
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ansprüche	9,12-15,19
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen:**

siehe Beiblatt

## **SCHRIFTLICHER BESCHEID**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02865

---

### **VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**SCHRIFTLICHER BESCHEID  
BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02865

**Ad section I.:**

Die diesem Bescheid zu Grunde liegenden Anmeldeunterlagen beinhalten ebenfalls die Seiten 1-9 des Sequenzprotokolls.

**Ad section V.:**

1. Auf das folgende Dokument wird in diesem Bescheid Bezug genommen:

D1 Mechanisms of Development 48, 153-164, 1994

2. Die vorliegende Internationale Anmeldung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem In humanen Keratinozyten verstärkt vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Desweiteren betrifft die vorliegende Internationale Anmeldung eine Nukleinsäure, die für ein solches, für humane Keratinozyten typisches Polypeptid, kodiert, die Verwendung dieses Polypeptids, dessen spezifische Antikörper, sowie der DNA für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke.

- 2.1 D1 beschreibt die Identifizierung und Isolierung einer Protein Kinase (*msk*), die nur in den Zellen des Myocardiums exprimiert wird, sowie der dafür kodierenden *msk* cDNA. Die *msk* Protein Kinase gehört zu der Familie der Serin/Threonin Protein Kinasen und weist eine signifikante Homologie zu den SNF1 Sequenzen aus Hefe auf. Die *msk* Proteinsequenz ist z.B. in 818 AA zu 78.4% identisch mit der in SEQ ID NO:3 gezeigten Aminosäuresequenz und in 2426 bp zu 76.5% identisch mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Nukleotidsequenz der vorliegenden Internationalen Anmeldung (S.D1, S.153, 'Abstract', S.162-163, 'Experimental procedures', Fig.2,4).

Das in D1 beschriebene Protein stellt somit ein Allel oder Derivat dar, welches durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, oder -inversion aus der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz entstanden sein könnte; die für das *msk* Protein kodierende DNA weist zudem Teilsequenzen auf, die der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:4 dargestellten Nukleotidsequenz entsprechen und ganz oder

**SCHRIFTLICHER BESCHEID  
BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02865

teilweise mit einer dieser vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisiert.

Das obige Dokument ist daher neuheitsschädlich für den Gegenstand der Ansprüche 1-8 und 18.

3. Zur Beurteilung eines erfinderischen Schrittes der Ansprüche 9, 12-15 und 19 der vorliegenden Internationalen Anmeldung wird Dokument D1 als der nächstliegende Stand der Technik herangezogen.

Der abhängige Anspruch 9 sowie die Verwendungsansprüche 12 und 19 scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, welche in Kombination mit den Merkmalen der Ansprüche auf die sie sich beziehen, einen erfinderischen Schritt beinhalten, da diese zusätzlichen Merkmale bzw. die Verwendung der/s Nukleinsäure/Polypeptids wohlbekannte Techniken und Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Molekular Biologie darstellen.

Darüberhinaus kann für die Verwendung eines bereits bekannten Polypeptids zur Herstellung eines Antikörpers sowie zur anschließenden allgemeinen Verwendung eines solchen Antikörpers in der Diagnose oder Therapie ein erfinderischer Schritt nicht anerkannt werden.

Der Gegenstand der Ansprüche 9, 12-15 und 19 beruht daher nicht auf einer nach Artikel 33(3) PCT erforderlichen erfinderischen Tätigkeit.

**Ad section VIII.:**

1. Ansprüche 1 und 2 mangelt es an Klarheit, auf Grund des Ausdrucks "...das einem... verstärkt exprimierten Protein **gleicht oder ähnlich ist**". Dieser Ausdruck ist absolut nichtsagend, sofern nicht geklärt ist, was unter gleichen oder ähnlichen Proteinen zu verstehen ist; sind damit Proteine gemeint, die annähernd das gleiche Molekulargewicht aufweisen oder solche deren biologische Funktionen identisch sind?
2. Ansprüche 2 und 5-7 mangelt es an Klarheit auf Grund der Ausdrücke

**SCHRIFTLICHER BESCHEID  
BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/02865

"hybridisierende Nukleotidsequenz" und "...mit der... hybridisiert". Da keinerlei technische Informationen über die Hybridisierungsbedingungen enthalten sind, sind diese Ausdrücke völlig ungenau und vage.

3. Den Ansprüchen 8, 10 und 17 mangelt es an Klarheit. Die in diesen Ansprüchen verwendete interne willkürliche Bezeichnung eines Proteins (pKe#122) ist für den Fachmann bedeutungslos und stellt keine Definition durch technische Merkmale dar.
4. Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß die in Ansprüchen 5, 8, 10, 12, 14 und 17-19 verwendeten Ausdrücke "vorzugsweise" oder "insbesondere" keine Beschränkung des Schutzzumfangs der Patentansprüche bewirken, d.h. das nach einem derartigen Ausdruck stehende Merkmal ist als ganz und gar fakultativ zu betrachten.
5. Der Anmelder wird darauf hingewiesen, das Anspruch 12 die Verwendung einer Nukleinsäure zur Herstellung **transgener Menschen** mit umfaßt. Im Falle einer Europäischen Anmeldung ist dieser Anspruch nicht gewährbar, da der Gegenstand dieses Anspruchs gegen die öffentliche Ordnung und die guten Sitten verstößt, und damit eigens von der Patentierbarkeit ausgeschlossen ist.



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup>:</b>  <b>C07K 14/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/17232</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. März 2000 (30.03.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> - PCT/DE99/02865  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 6. September 1999 (06.09.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 42 863.4 19. September 1998 (19.09.98) DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> KRAMER, Michael [DE/DE]; Bergstrasse 85, D-64319 Pfungstadt (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BECHTEL, Michael [DE/DE]; Edelsteinstrasse, D-69198 Schriesheim (DE). REINARTZ, Jeanette [DE/DE]; Angelweg 2, D-69121 Heidelberg (DE). SCHÄFER, Birgit [DE/DE]; Odenwaldstrasse 49/2, D-69124 Heidelberg (DE). WALLICH, Reinhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 52/1, D-69118 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> REGULATORY PROTEIN FROM HUMAN KERATINOCYTES		
<b>(54) Bezeichnung:</b> REGULATORISCHES PROTEIN AUS HUMANEN KERATINOZYTEN		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention relates to an isolated polypeptide which is equivalent to or similar (i.e., equivalent in function and effect) to a protein which is naturally occurring in human keratinocytes and which is increasingly expressed in the activated state of the keratinocytes. The invention also relates to an isolated nucleic acid encoding such a polypeptide or protein typical of human keratinocytes, as well as to the use of said polypeptide and said nucleic acid for the purpose of assays, particularly for diagnostic purposes, and/or for therapeutic purposes, or to the use of reagents, particularly of recombinant vector molecules and antibodies directed against such molecules. The inventive protein has an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 of the sequence listing or an allele or derivative of said amino acid sequence derived by amino acid substitution, deletion, insertion or inversion. The inventive nucleic acid has a nucleotide sequence as depicted in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4 of the sequence listing or a nucleotide sequence complementary thereto or a partial sequence of one of these nucleotide sequences or a nucleotide sequence which fully or partially hybridizes to any of the above-mentioned nucleotide sequences.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b>		
<p>Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinanten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle. Das erfindungsgemäße Protein weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:3 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz auf, und die erfindungsgemäße Nukleinsäure weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer der vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisierenden Nukleotidsequenz auf.</p>		

## Regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten

### B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinanten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle.

Nach dem gegenwärtigen Stand der Technik werden in der Dermatotherapie zur Beeinflussung epidermaler Störungen wie z.B. der Autoimmundermatosen "Pemphigus vulgaris" und "Bullöses Pemphigoid" im wesentlichen Medikamente mit breitem Wirkungsspektrum eingesetzt, wie z.B. lokal bzw. systemisch applizierte Glukokortikoide, Vitamin-A-Säure-Derivate, Antimetabolite und Zytostatika, oder es wird mit mehr oder weniger unspezifischen Maßnahmen wie z.B. der sog. "Farbstofftherapie" oder der "Lichttherapie" behandelt. Die bekannten Wirkstoffe bzw. Maßnahmen haben jedoch allesamt den Nachteil, daß sie wenig spezifisch sind und damit naturgemäß zahlreiche Nebenwirkungen hervorrufen.

Die Bereitstellung spezifischerer Wirkstoffe scheiterte bislang an dem in der Dermatologie seit langem bestehenden grundsätzlichen Problem, daß die Zahl der zellulären Zielmoleküle (Zielstrukturen, Targets), die als Angriffspunkt für eine (spezifische) Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels — insbesondere unter medizinischen oder auch kosmetischen Gesichtspunkten — dienen könnten, in epidermalen Keratinozyten eng begrenzt ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, neue Zielstrukturen in epidermalen Keratinozyten bereitzustellen, die als Angriffspunkt für Diagnostika, Therapeutika, Kosmetika oder allgemein für die Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels dienen können.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Proteins der eingangs genannten Art, das bei aktivierten Keratinozyten aufreguliert, d.h. vermehrt exprimiert bzw. produziert und auf einem höheren Konzentrationsspiegel gehalten wird, und das entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:3 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion aus einer dieser beiden Aminosäuresequenzen entstandenes Allel oder Derivat aufweist. Das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 wird im folgenden auch mit Protein pKe#122 bezeichnet.

Eine weitere Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer isolierten Nukleinsäure, die ein Protein kodiert, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist, und die entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine zu einer dieser beiden komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden dargestellten oder komplementären Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist, wobei in diesen beiden Sequenzprotokollen anstelle von "T" auch "U" stehen kann. Zu dieser erfindungsgemäßen Gruppe von Nukleinsäuren bzw. Nukleotidsequenzen gehören insbesondere auch Splice-Varianten und Sense- oder Antisense-Oligonukleotide, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellten Nukleotidsequenz hybridisieren, vorzugsweise identisch mit bzw. komplementär zu wenigstens einer dieser beiden sind.

Die Erfindung umfaßt infolgedessen auch Proteine bzw. Polypeptide der eingangs genannten Art, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, welche aus einer solchen Splice-Variante resultiert, insbesondere aus der Splice-Variante einer mRNA, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 oder der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 4 angegebenen Nukleotidsequenz identisch oder komplementär dazu ist.

Die erfindungsgemäßen Sense- oder Antisense-Oligonukleotide umfassen mindestens 6, vorzugsweise 8 bis 25 Nukleotide.

Der Begriff "hybridisiert" bezieht sich auf die im Stand der Technik bekannten Hybridisierungsverfahren unter üblichen, insbesondere unter hoch stringenten Hybridisierungsbedingungen. Die konkreten Hybridisierungsparameter wählt der Fachmann anhand der eingesetzten Nukleotidsequenz und seines allgemeinen Fachwissens (vgl.: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons Inc., Suppl. 37, Chapter 4.9.14).

Die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäure(n) kann (können) sowohl aus einer natürlichen Quelle als auch synthetisch oder halbsynthetisch gewonnen werden. In der Praxis hat sich besonders ihre Ausführung als cDNA bewährt.

Das Polypeptid, das die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 aufweist und von der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 oder im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 4 dargestellten Nukleinsäure kodiert wird, und das im folgenden als Protein pKe#122 bezeichnet ist, wird in humanen epidermalen Keratinozyten aufreguliert, nämlich verstärkt exprimiert (produziert) und auf einem im Vergleich zum Ausgangszustand signifikant höheren Konzentrationsspiegel gehalten, wenn sich diese Zellen im "aktivierten" Zustand befinden, d.h. unter anderem im Zustand der Proliferation und/oder Migration, z.B. nach einer unfallbedingten Hautverletzung oder bei den autoimmunologisch ausgelösten bullösen Dermatosen "Pemphigus vulgaris" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Desmosomen) und "Bullöses Pemphigoid" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Hemidesmosomen). Der aktivierte Zustand der

humanen epidermalen Keratinozyten äußert sich auch in einer im Vergleich zum Ruhezustand (Ausgangszustand) erhöhten Expression der bekannten Aktivierungsmarker uPA (Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und uPA-R (Rezeptor für Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und kann anhand dieser Marker qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. (Vgl.: Schäfer B.M., Reinartz J., Bechtel M.J., Inndorf S., Lang E., und Kramer M. D., 1996: *Dispase mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87)*, *Exp. Cell Res.* 228, S. 246-253).

Das Protein pKe#122 weist ein Serin/Threonin-Kinase-Motiv, mehrere (vier) Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive und eine Kinase-Domäne mit ATP-Bindungsstelle auf. Es ist offensichtlich in Signalübertragungsvorgänge eingebunden, hat sehr wahrscheinlich eine Serin/Threonin-Kinase -Funktion und spielt eine mutmaßliche Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell- und/oder von Zell-Matrix-Verbindungen und/oder von Desmosomen und/oder von Hemidesmosomen.

Im Stand der Technik ist es bekannt, daß Serin/Threonin-Kinasen in Keratinozyten die Funktion von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten beeinflussen. Von S. Blum und Koautoren wurde gezeigt, daß die Lokalisation bestimmter Zellkontakt-Moleküle der *Zonula adhaerens* durch Aktivierung bzw. Inaktivierung der Serin/Threonin Kinase des Typs "Proteinkinase C (PKC)" beeinflußt werden kann (vgl. Blum S., Ness W., Petrow W., Achenbach F., 1994: *Localization of protein kinase C in primary cultures of human keratinocytes in relation to cell contact proteins*. *Cell Sig.* 6:157-165). Und M. Serres und Koautoren haben gezeigt, daß die Behandlung von Keratinozyten in Zellkultur (HaCaT-Zellen) mit den Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitoren Okadainsäure, Calyculin und Pefabloc<sup>TM</sup> einerseits zu einem Verlust der Zell-Zell-Verbindungen und andererseits zu einer verstärkten Serin/Threonin Phosphorylierung des in die Zelladhäsion involvierten Linkerproteins  $\beta$ -Catenin führt (vgl. Serres M., Grangeasse C., Haftek M., Durocher Y., Duclos B., Schmitt D., 1997: *Hyperphosphorylation of  $\beta$ -Catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell-contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells*. *Exp. Cell. Res.* 231: 163-172). Diese in-

in-vitro-Befunde wurden an epidermalen Keratinozyten explantierter humaner Haut bestätigt: nach Applikation von Okadainsäure (2  $\mu$ M, 24 Std.) trat eine deutliche Störung epidermaler Zell/Zell-Verbindungen mit Akantholyse auf. Weder PKC-Aktivatoren (wie z.B. Bryostatin-1 oder TPA = PMA = Phorbol Myristat Azetat) und PKC-Inhibitoren (Sphingosin, Staurosporin, Chelerythrin, H7 = 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine) noch Inhibitoren oder Aktivatoren der Proteinkinase A (PKA), noch Tyrosinkinase- und Phosphatase-Inhibitoren oder weniger spezifische Phosphatase-Inhibitoren hatten einen derartigen Effekt auf die Zellen.

Auch bei der Ausbildung von Hemidesmosomen spielen Serin/Threonin-Kinasen eine wichtige Rolle (vgl. Mainiero F., Pepe A., Wary K.K., Spinardi L., Mohammadi M., Schlessinger J., Giancotti F.G., 1995: *Signal transduction by the  $\alpha 6 \beta 4$  integrin: distinct  $\beta 4$  subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes*. EMBO J. 14:4470-4481).

Mit der isolierten Bereitstellung des Proteins pKe#122, nämlich mit der Beschreibung von Nukleotidsequenzen, die dieses Protein kodieren, und mit der Angabe (einer) seiner Aminosäuresequenz(en) ist es möglich, den Stoffwechsel von physiologisch aktiven bzw. aktivierten Keratinozyten — und selbstverständlich auch von anderen das Protein pKe#122 exprimierenden Zellen — gezielt zu beeinflussen, insbesondere zu Zwecken der medizinischen und kosmetischen Therapie.

Die Erfindung betrifft desweiteren rekombinante DNS-Vektormoleküle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfassen, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweisen. Bei den DNS-Vektormolekülen handelt es sich vorzugsweise um das Plasmid pUEx-1 und/oder um das Plasmid pGEX-2T und/oder um das Plasmid pBK-CMV und/oder um das Plasmid pHR 2 (ein Abkömmling von Bluescript KS [Firma Stratagene, Heidelberg], enthält den humanen Keratin-14-Promotor), da sich diese Vektoren in der Praxis als sehr gut geeignet erwiesen haben.

Als eukaryontische Zelle kommen insbesondere Zellen aus Zellkulturen, z.B. COS-Zellen, in Betracht, ebenso gut kann die betreffende Zelle aber auch Bestandteil eines lebenden Organismus, z.B. einer transgenen Maus, sein.

Die Erfindung umfaßt deshalb auch transformierte Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, die mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in diesen Zellen natürlicherweise oder als Folgen einer Rekombination enthalten ist, und die (infolgedessen) die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, besitzen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines erfindungsgemäßen Vektormoleküls zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.

Die erfindungsgemäßen Transfektanten eröffnen die Möglichkeit für Forschungs- und Entwicklungsarbeiten im Hinblick auf eine weitergehende Aufklärung der durch das Protein pKe#122-induzierten Veränderungen der Zellmorphologie und zellulären Basisfunktionen wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung, insbesondere im Hinblick auf die Beantwortung der Frage, ob das Proteins pKe#122 selbst eine "pathogene" Aktivität besitzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, wobei dieses Reagenz dadurch charakterisiert ist, daß es wenigstens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt. " Zum indirekten Nachweis" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß tatsächlich die das Protein kodierende mRNA direkt nachgewiesen wird — und somit das Protein nur indirekt (vermittels dieser mRNA).

Das Protein pKe#122 und die damit, d.h. mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:2** oder im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:3** dargestellten Aminosäuresequenz, verwandten Polypeptide, nämlich die Polypeptide, die durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Inversion von einer dieser Aminosäuresequenzen gemäß **SEQ ID NO:2** oder **SEQ ID NO:3** ableitbar sind, oder die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert, welche mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:1** oder mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:4** oder mit einer Teilsequenz dieser Nukleotidsequenzen identisch oder komplementär dazu ist oder zumindest hybridisiert, bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der dermatologischen Forschung und Entwicklung. Insbesondere können Antikörper gegen diese Polypeptide bzw. Proteine hergestellt werden, die dann mit entsprechender Modifikation entweder als Diagnostika oder als Therapeutika oder auch als Kosmetika ("cosmeceuticals") einsetzbar sind.

Die Erfindung umfaßt folglich auch die Verwendung eines solchen Proteins bzw. Polypeptids zur Herstellung eines (monoklonalen, polyklonalen oder rekombinanten) Antikörpers gegen dieses Polypeptid, den besagten Antikörper selbst und ebenso seine Verwendung zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen, zur kosmetischen Behandlung der Epidermis und zur diagnostischen, therapeutischen und/oder kosmetischen Behandlung von anderen das Protein pKe#122 exprimierenden Geweben oder Organen.

Auch Sense- und/oder Antisense-Oligonukleotide kommen nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen als Wirkstoffe für eine Pharmakotherapie in Betracht (vgl. G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 24, C1115-C1119) — und überdies als Wirkstoffe mit einem in der Pharmakotherapie grundsätzlich neuen Wirkprinzip.

Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Sense- oder Antisense-Oligonukleotide zur diagnostischen und/oder therapeutischen



Behandlung, insbesondere von dermatologischen Erkrankungen, oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis.

Eine technisch und wirtschaftlich bedeutende Einsatzmöglichkeit eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuren besteht nicht zuletzt auch darin, daß mit Hilfe eines solchen Moleküls in einem Screening-Verfahren aus einer sehr großen Anzahl bereitstehender Stoffe solche herausselektiert werden können, die spezifisch an die betreffende Nukleinsäure oder das betreffende Polypeptid binden. Diese Stoffe können dann als Ausgangsmaterial (Leitstruktur) für die Entwicklung pharmakologisch einsetzbarer Substanzen dienen und bieten damit die Voraussetzungen für die Entwicklung alternativer Pharmazeutika zur Diagnose und Therapie, insbesondere der eingangs erwähnten dermatologischen Erkrankungen.

Im Hinblick darauf betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Identifizierung von pharmakologisch einsetzbaren Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen bzw. deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere inhibierend oder aktivierend wirken.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Herstellungs- und Anwendungsbeispielen näher erläutert.

#### **Beispiel 1: Herstellung des Proteins pKe#122**

##### A) Gewinnung bzw. Herstellung eines Polynukleotids, das das Protein pKe#122 kodiert

Als Polynukleotid-Quelle dienten humane epidermale Keratinozyten einer Zellkultur bzw. eines Zellkulturmodells, das in der Publikation von Schäfer B.M., Reinartz J., Bechtel M.J., Inndorf S., Lang E., und Kramer M. D., 1996: *Dispase mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87)*, *Exp. Cell Res.* 228, S. 246-253, ausführlich beschrieben ist. Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen. Diese Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodell zeichnet sich dadurch aus, daß sie/es erlaubt, Keratinozyten durch enzymatische Zerstörung der Zell/Matrix-Kontakte,

d.h. durch eine beispielsweise Dispase-induzierte Ablösung der Keratinozyten von der Kulturmatrix, vom ruhenden [ $uPA^-/uPA-R^-$ ] in den aktivierten [ $uPA^+/uPA-R^+$ ] Zustand zu überführen. Die Induktion des aktivierten Zustands ist reversibel: die (erneute) Ausbildung eines konfluenten (= maximal dicht gewachsenen), mehrschichtigen Zellverbands aus differenzierten Keratinozyten führt zur Abregulierung von uPA und uPA-R, d.h. zur Drosselung der Produktion und Einstellung auf einem niedrigeren Konzentrationsspiegel (siehe dazu die Publikation von Schäfer B.M., Stark H.J., Fusenig N.E., Rodd R.F., Kramer M.D., 1996 *Differential expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPA-R), and inhibitor type-2 (PAI-2) during differentiation of keratinocytes in an organotypic coculture system*, Exp. Cell Res. 220:415-423).

Die Zellen dieser Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodells werden im folgenden auch als NHEK (= "normale humane epidermale Keratinozyten") bezeichnet.

Für die Bereitstellung der Zellkultur bzw. des Zellkulturmodells wurden folgende Maßnahmen durchgeführt: Mittels Hautbiopsie erhaltene humane epidermale Keratinozyten wurden über Nacht bei 4 °C trypsiniert und anschließend nach der "feeder-layer"-Technik von J.G. Rheinwald und H. Green (1975, Cell 6, 331-334) in Petrischalen oder 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen für die Dauer von 8 Tagen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Gehalt von 10% (Vol./Vol.) fetalem Kälberserum (FCS) und Zusätzen an Adeninhemisulfat, Insulin, Transferrin, Trijodthyronin, Hydrocortison, Forskolin, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin und Gentamycin) unter Differenzierungsbedingungen, nämlich erhöhten Kalziumspiegeln, kultiviert (37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>). Die Kultivierung erfolgte damit gemäß herkömmlicher und im Stand der Technik geläufigen Bedingungen. Unter diesen Bedingungen bilden Keratinozyten konfluente zwei- bis dreischichtige sog. "Epidermisäquivalente" oder Keratinozyten-"Sheets" aus.

Diese Epidermisäquivalente oder Keratinozytensheets wurden durch eine 30-minütige Behandlung mit Dispase II (2,4 mg/ml in DMEM ohne FCS) von der Kulturmatrix

abgelöst, zweimal in DMEM gewaschen und anschließend für die Dauer von 4 bzw. 8 Stunden in komplettem, konditioniertem DMEM inkubiert. Die Inkubation in konditioniertem DMEM erfolgte, um den Einfluß von frischem FCS auszuschließen. Während der Inkubation fand in diesen flotierenden Keratinozytensheets eine Aufregulierung der Expression der bekannten Aktivierungsmarker uPA und uPA-R sowie des hierin erstmals beschriebenen Proteins pKe#122 statt. Die uPA/uPA-R-Aufregulierung war mittels bekannten Techniken wie Enzyme-Linked-Immunosorbent- Assay (ELISA), In-situ Hybridisierung und Immunfluoreszenz nachweisbar. Aus den inkubierten Zellen wurde mittels der im Stand der Technik bekannten Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (vgl: Chromczynski P. and Sacchi N., 1986: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 162:156-159) die gesamte RNA gewonnen (Kit "RNA-Clean" der Firma AGS aus Heidelberg). Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA mittels Bindung an poly-T-beschichtete Kügelchen isoliert. Diese mRNA diente als Ausgangsmaterial für den nächstfolgenden Verfahrensabschnitt der Subtraktionsklonierung.

Für den Einsatz in Kontrollversuchen bzw. für Vergleichspräparate wurde mRNA von adhärenenten Keratinozytensheets isoliert, und zwar nach dem gleichen Verfahrensmuster wie vorstehend beschrieben, ausgenommen der Abweichung, daß für die Dauer der Dispasebehandlung zusätzlich zu der Dispase ein Dispasehemmer, z.B. Phosphoramidon (100µg/ml), appliziert wurde.

Nach dem Prinzip der Subtraktionsklonierung wurde eine Genbank erstellt, die vorzugsweise cDNA der dyshäsionsinduzierten Gene enthielt, d.h. solcher Gene, die nach Ablösung der Keratinozytensheets vermehrt in diesen (bzw. deren Zellen) exprimiert wurden. Zu diesem Zweck wurde die aus den Zellen der adhärenenten Keratinozytensheets gewonnene mRNA erneut an poly-T-beschichtete Kügelchen gebunden, auf diesen in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend gegen die mRNA von abgelösten, d.h. nicht-adhärenenten Keratinozytensheets hybridisiert. Diejenigen mRNA-Moleküle, die lediglich im nicht-adhärenenten Zustand, d.h. nach Dyshäsion exprimiert

wurden und infolgedessen keinen Hybridisierungspartner fanden, verblieben im Überstand. Sie wurden in cDNA umgeschrieben und in den Klonierungsvektor pUEX-1 kloniert.

Die daraus resultierende Genbank wurde zwecks Überprüfung anschließend noch einem Southernblot-Verfahren mit [<sup>32</sup>P]-markierter cDNA adhärenter und nicht-adhärenter Keratinozytensheets unterworfen. Diejenige cDNA oder vielmehr die sie enthaltenden Wirtszellklone - hier der E. coli Stamm MC1061 -, die nach Dyshäsion eine deutliche Aufregulation zeigten, wurden anschließend über Nacht bei 30 °C unter üblichen Kulturbedingungen kultiviert bzw. vermehrt. Aus diesen E. coli-Klonen wurde die Plasmid-DNA (pUEX1-cDNA) herauspräpariert, und die aus dem pUEX1-Vektor herausgeschnittenen cDNA-Fragmente wurden mittels Random-priming [<sup>32</sup>P]-markiert. Die markierte cDNA wurde als Sonde in Northernblots mit RNA aus adhärenenten und nicht-adhärenenten Keratinozytensheets eingesetzt. Die Klone, die cDNA enthielten, die bei Verwendung als Sonde im Northernblot-Verfahren kein oder nur ein geringes Signal mit der RNA adhärenter Keratinozyten, dagegen ein deutliches Signal mit RNA nicht-adhärenter Keratinozytensheets erkennen ließen, wurden für den nachfolgenden Verfahrensabschnitt der Sequenzierung ausgewählt.

Bei der Sequenzierung der betreffenden Klone mittels des "nicht-radioaktiven Cycle-Sequencing", das eine Modifikation der Sequenzierungsmethode nach Sanger darstellt und mittlerweile eine im Stand der Technik geläufige Methode ist, wurde das Gen mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:4 gefunden. Dieses Gen und das zugehörige Protein erhielten die Bezeichnung pKe#122. Nähere Untersuchungen der zu dem Gen pKe#122 gehörigen d.h. pKe#122-spezifischen mRNA (aus abgelösten, d.h. nicht-adhärenenten Keratinozytensheets) lieferten die Informationen, daß diese mRNA eine Größe von etwa 4,8 kb aufweist und nach Dispase-induzierter Ablösung eine Aufregulation zeigt. Fig. 1 zeigt das Ergebnis eines Northernblots, der mit mRNA aus Keratinozytensheets (a) direkt nach bzw. (b) vier Stunden nach Dispase-induzierter Ablösung und mit [<sup>32</sup>P]-markierter pKe#122-cDNA durchgeführt wurde. Dieses Ergebnis beinhaltet die Aussage, daß direkt nach der Ablösung wenig pKe#122-mRNA

vorhanden oder jedenfalls nachweisbar war, vier Stunden später dagegen große Mengen vorlagen (eine breitere, farbintensivere Bande), und zwar in der Molekulargewichtszone von etwa 4,8 kb.

Die Nukleotidsequenz des Gens pKe#122 enthält am 3'-Ende an Position 2373-2375 gemäß SEQ ID NO:1 und dementsprechend an Position 2472-2474 gemäß SEQ ID NO:4 ein Stopcodon, das den mutmaßlichen Ort des Transkriptionsendes vorgibt, und dem genau 28 Nukleinsäuren vor der poly-A-Site eine der sog. "Polyadenylation site" (AATAAA) sehr ähnliche Sequenz, nämlich AATAA, folgt.

Damit ergibt sich für die Gesamtstruktur des pKe#122 -Gens bzw. verallgemeinert eines Polynukleotids, welches für das Protein pKe#122 kodiert, daß dieses Gen bzw. Polynukleotid die im Sequenzprotokoll SEQ IN NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ IN NO:4 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen aufweist oder eine Nukleotidsequenz umfaßt oder daraus besteht, die zu einer dieser dargestellten Nukleotidsequenzen oder einer deren Teilsequenzen komplementär ist, oder daß dieses Gen bzw. Polynukleotid ganz oder teilweise mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellten Nukleotidsequenz oder mit einer Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder mit einer zu diesen dargestellten Nukleotidsequenzen oder deren Teilsequenzen komplementären Sequenz hybridisiert, wobei in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:4 anstelle von "T" auch ein "U" stehen kann, und daß von diesem Gen bzw. Polynukleotid eine mRNA abgelesen wird, die einer cDNA von ca. 4,8 kb entspricht bzw. homolog ist.

B) Ableitung der Aminosäurenabfolge und Charakterisierung des Proteins pKe#122 anhand des dafür kodierenden Polynukleotids (pKe#122 -Gens)

Anhand des genetischen Codes wurde mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens (Programm: *HUSAR = Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*, Version 4.0, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 1997) von der Nukleotidsequenz gemäß

Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:1** und **SEQ ID NO:4** jeweils eine Aminosäuresequenz abgeleitet, die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:2** bzw. und **SEQ ID NO:3** dargestellt ist. Die strukturelle Analyse dieser Aminosäuresequenzen gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:2** und **SEQ ID NO:3** mit eben diesem Programm lieferte die folgenden Informationen, die für beide Aminosäuresequenzen gültig sind:

- die Aminosäureabfolge von Position 40 bis 63 (LGKGNFAVVKLARHRVTK TQVAIK) gemäß **SEQ ID NO:2** und dementsprechend von Position 73 bis 96 gemäß **SEQ ID NO:3** entspricht bekannten Proteinkinase-Motiven mit ATP-Bindungsstelle,
- die Aminosäureabfolge von Position 152 bis 164 (IVHRDLKTENLLL) gemäß **SEQ ID NO:2** und dementsprechend von Position 185 bis 197 gemäß **SEQ ID NO:3** entspricht bekannten Serin/Threonin-Proteinkinase-Motiven,
- die Aminosäureabfolgen von Position 238 bis 240 (TLR), von Position 475 bis 477 (TGR), von Position 485 bis 487 (STR) und von Position 600 bis 603 (TTR) gemäß **SEQ ID NO:2** und von Position 271 bis 273 (TLR), von Position 508 bis 510 (TGR), von Position 518 bis 520 (STR) und von Position 633 bis 635 (TTR) gemäß **SEQ ID NO:3** entsprechen bekannten Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C,
- die Aminosäureabfolge von Position 138 bis 156 (WQILSAVEYCHDHHIVHRD) gemäß **SEQ ID NO:2** und dementsprechend von Position 171 bis 189 gemäß **SEQ ID NO:3** stellt das pKe#122-1-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-1" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2),
- die Aminosäureabfolge von Position 481 bis 499 (LAEVSTRLSPLTAPCIVVS) gemäß **SEQ ID NO:2** und dementsprechend von Position 514 bis 532 gemäß **SEQ ID NO:3** stellt das pKe#122-2-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-2" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2),
- die Aminosäureabfolge von Position 339 - 352 (NHFAAIYYLLLERL) gemäß **SEQ ID NO:2** und dementsprechend von Position 372 - 385 gemäß **SEQ ID NO:3** stellt das pKe#122-3-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-3" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2),
- die Aminosäureabfolge von Position 614 - 625 (GLARQVCQVPAS) gemäß **SEQ ID NO:2** und dementsprechend von Position 647 - 658 gemäß **SEQ ID NO:3**

stellt das pKe#122-4-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-4" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2).

In Fig. 2 (für SEQ ID NO:2) und in Fig. 14 (für SEQ ID NO:3) sind diese Strukturdaten des Proteins pKe#122 schematisch dargestellt. Fig. 2A und Fig. 14A zeigen das Proteinkinase-Motiv mit ATP-Bindungsstellen, das Serin/Threonin-Proteinkinase-Motiv und die vier Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C, und Fig. 2B und Fig. 14B zeigen die Sequenzabschnitte, gegen die anti-Peptid-Antikörper in Kaninchen hergestellt wurden.

#### **Beispiel 2: Verwendung der Aminosäuresequenz des Proteins pKe#122 zur Herstellung polyklonaler Anti-Peptid-Antikörper**

Mittels computergestützter Antigenizitätsanalyse unter Verwendung des in Beispiel 1 genannten Computerprogramms wurden Bereiche aus der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 ausgewählt, die zur Produktion polyklonaler Anti-Peptid-Antikörper geeignet erschienen. Diese Bereiche wurden nach dem bekannten "Multiple-Antigenic-Peptide"-Verfahren (vgl.: Posnett D.N., Tam J.P., 1989: *Multiple antigenic peptide method for producing antipeptide site-specific antibodies*. Methods-Enzymol. 1998; 178: 739-746) in Form separater Peptide (pKe#122-1 bis -4, vgl. Abb.2) mit einem Molekulargewicht von ca. 10-15 kD synthetisiert. Diese Peptide wurden ohne Zusatz einer Trägersubstanz zur adjuvanzunterstützten Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Details dieses Peptid-Herstellungsverfahrens und dieses Immunisierungsverfahrens sind im Stand der Technik allgemein geläufig. Die Prä- und Postimmunseren wurden mit dem allgemein bekannten Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) auf die Reaktivität mit den jeweils zur Immunisierung verwendeten Peptiden und Vergleichspeptiden getestet. Es war eine deutliche Immunisierung gegen die Peptide pKe#122-1, -122-2 und -122-4 nachweisbar. Zur Aufreinigung der polyklonalen Antikörper wurden die Postimmunseren zunächst einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen und dadurch die IgG-Fraktion angereichert. Mit dieser angereicherten IgG-Fraktion wurde anschließend eine

Immunaффinitätschromatographie durchgeführt. Hierfür wurden jeweils die vier zur Immunisierung verwendeten Peptide pKe#122-1 bis -4 an Sepharose 4B immobilisiert und diese Peptid-Sepharose-4B-Konjugate in der Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Es resultierten drei weitgehend reine anti-Peptid-IgG-Fractionen, nämlich anti-Peptid pKe#122-1, anti-Peptid pKe#122-2 und anti-Peptid pKe#122-4. Diese drei affinitätsgereinigten Antikörperfraktionen zeigten eine eindeutige Immunreaktion mit dem jeweils korrespondierenden Antigen-Peptid. In Tabelle 1 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Mit dem Immuns serum gegen das Peptid pKe#122-1, dem polyklonalen Antikörper anti-pKe#122-1, wurden außerdem Zellsate der Keratinozytenlinie HaCaT und der Keratinozytensheets 8 Stunden nach Ablösung mit Dispase (= nicht-adhärente Keratinozytensheets) im Westernblot-Verfahren auf die Expression des Proteins pKe#122 getestet. Sowohl in den HaCaT-Zellen als auch in den Zellen der abgelösten (nicht-adhärenten) Keratinozytensheets wurde eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca 70 – 85 kD nachgewiesen. Der zum Experiment zugehörige Westernblot ist in Beispiel 3B(2) ausführlich beschrieben und in Fig. 3 dargestellt. Er zeigt sowohl in HaCaT-Zellen als auch in den nicht-adhärenten Keratinozytensheets ein Protein der Größe ca. 70 – 85 kD.

Der polyklonale Anti-Peptid-Antikörper pKe#122-1 wurde darüberhinaus mit dem hier in Beispiel 5 beschriebenen rekombinanten ca. 100 kD GST-pKe#122-Fusionsprotein (Fraktion 85 in Abb. 10 B) im Immunoblot-Verfahren ausgetestet. Der polyklonale Anti-Peptid-Antikörper pKe#122-1 reagierte mit dem Fusionsprotein. Diese positive Reaktion wurde durch Vergleich mit Kontrollversuchen bestätigt, bei denen anstelle des Anti-Peptid-Antikörpers pKe#122-1 ein anti-GST-Antikörper, oder aber normales Kaninchen-IgG eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 4 dargestellt. Spur "a" in Fig. 4 zeigt den Kontrollansatz mit Ziege-Normal-IgG, Spur "b" in Fig. 4 zeigt den Ansatz mit Ziege-anti-GST-IgG, Spur "c" in Fig. 4 zeigt den Ansatz mit Kaninchen-Normal-IgG und Spur "d" in Fig. 4 zeigt den Ansatz mit Kaninchen-anti-pKe#122-1.



**Beispiel 3: Verwendung des Proteins pKe#122 bzw. gegen das Protein oder gegen die mRNA des pKe#122-gerichtete Reagenzien zum Nachweis des aktivierten Zustands humaner epidermaler Keratinozyten**

**A) Verwendete Keratinozyten**

Als Versuchszellen bzw. Targetzellen (=Zielobjektzellen) dienten HaCaT-Zellen und humane epidermale Keratinozyten der Zellkultur bzw. des Zellkulturmodells (NHEK), das in der Publikation B.M. Schäfer und Koautoren (a.a.O.) ausführlich beschrieben und hier im Beispiel 1 (A) kurz zusammengefaßt ist. Auf den Inhalt dieser Publikation wird auch an dieser Stelle ausdrücklich Bezug genommen. Desweiteren wurden Hautbiopsien auf die Expression des pKe#122-Proteins untersucht.

B) Nachweisverfahren, die auf der Anwendung der gegen das Protein pKe#122 gerichteten Antikörper beruhen

**1. Immunhistologie**

Mit Hilfe eines Kryotoms werden 5 µm-dicke Gefrierschnitte von Geweben aus Hautbiopsien von klinisch unauffälliger Normalhaut und klinisch auffälliger, läsionaler Haut infolge der Erkrankungen Pemphigus vulgaris, Bullöses Pemphigoid und Psoriasis vulgaris hergestellt. Diese werden bei Raumtemperatur getrocknet und in 100% Azeton fixiert (anstelle von Azeton kann ebenso gut auch 100% Methanol, 100% Ethanol oder 4%-iges Paraformaldehyd verwendet werden). Danach werden die Schnitte gemäß im Stand der Technik bekannter sog. "Blockierungsverfahren" behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Im vorliegenden Beispielfall wurden zwei Blockierungsschritte durchgeführt: (1.) eine Blockierung mit Avidin/Biotin und (2.) eine Blockierung mit Normalserum. Im ersten Blockierungsschritt wurde die Avidin/Biotin-Blockierung unter Verwendung des Avidin-Biotin-Blockierungskits der Firma Vector-Laboratories nach Herstellervorschrift durchgeführt, d.h. es wurde bei Raumtemperatur zunächst 15 Minuten mit der Avidin-Fertiglösung und nachfolgend 15 Minuten mit der Biotin-Fertiglösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit

10 Vol.-% Normalserum in PBS (Normalserum der Spezies, aus der der Zweit-Antikörper stammt, hier Ziege-Normalserum; PBS = Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,2-7,4) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß an die Blockierung werden die Schnitte in PBS mit einem Gehalt an 5 µg/ml anti-Peptid-pKe#122-1 für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des nichtgebundenen Antikörpers werden die Schnitte anschließend in PBS mit einem Gehalt an 0,2 % (Gewicht/Volumen) bovinem Serumalbumin gewaschen. Es folgt die Inkubation mit einem beispielsweise Biotin-markierten und gegen Kaninchen-IgG-gerichteten Antikörper aus der Ziege (1:500 verdünnt in PBS/ 0,2% BSA; 30 Minuten bei Raumtemperatur), ein weiterer Waschschriff sowie die Aufbringung eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-markierten Streptavidins (1 : 1 000 in PBS/0,2 % BSA verdünnt). Anstelle von Cy3 kann auch ein anderer Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung des Streptavidins verwendet werden, z.B. FITC. Nach einem letzten Waschschriff werden die Schnitte mit Eindeckmedium, z.B. Elvanol oder Histogel, eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht und ausgewertet. In Fig.5 sind die Ergebnisse eines derart durchgeführten Immunfluoreszenznachweises gezeigt: Der anti- pKe#122-1 IgG Antikörper färbt auf Normalhautschnitten Keratinozyten im Bereich der epidermalen Basalmembranzzone an (Fig 5 A). Bei Färbung von Biopsien läsionaler Haut infolge der Erkrankungen Pemphigus vulgaris (Fig. 5 B), Bullösem Pemphigoid (Fig. 5 C) oder Psoriasis vulgaris (Fig. 5 D) zeigt sich eine auffällig starke Färbung in epidermalen Keratinozyten, insbesondere im Bereich epidermaler Läsionen. Dort hat demnach eine verstärkte Expression und eine offensichtlichen Aufregulation des Proteins pKe#122 stattgefunden.

## 2. Immuno-Blot ("Western-Blot") und Dotblot

In Fig. 3 ist der Nachweis des pKe#122-Proteins mittels Westernblot-Verfahren unter Verwendung von anti-pKe#122-1 dargestellt. Hierfür wurden Zellysate der Keratinozytenlinie HaCaT (Proben "HaCaT") und von Keratinozytensheets 8 Stunden nach Dispasebehandlung (Proben "NHEK 8h") elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden nach Standardverfahren auf eine

Nitrozellulosemembran geblottet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde eine Inkubation mit 5 Gew.-% Milchpulver/TBS-Puffer durchgeführt. Anschließend wurden die (Protein-)Streifen mit der Bezeichnung "anti-122-1" in 3 %-Milchpulver/TBS-Puffer unter Zusatz von anti-pKe#122-1-Antikörpern (1 µg/ml) und die (Protein-)Streifen mit der Bezeichnung "rIgG" in 3 %-Milchpulver/TBS-Puffer unter Zusatz von Kaninchen-Normal-IgG (1 µg/ml) jeweils bei 4°C für ca. 18 Stunden (über Nacht) inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde danach mit TBS/Tween- und TBS-Puffer gewaschen und mit einem Enzym-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in 3%-Milchpulver/TBS-Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS/Tween und TBS wurden die gebundenen Antikörper mit einem peroxidase-spezifischen Lumineszenzsubstrat (hier beispielsweise das ECL-System der Firma Amersham-Buchler) sichtbar gemacht und autoradiographisch dargestellt. Auch eine alternative Markierung mit chromogenen Substraten ist gut möglich.

Die Zellysate können auch ohne vorhergehende elektrophoretische Auftrennung direkt auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und wie vorstehend beschrieben weiterbehandelt werden.

### **3. Enzyme-linked- immunosorbent-assay (ELISA)**

Mikrotiterplatten werden mit rekombinantem pKe#122/GST-Fusionsprotein in unterschiedlichen Konzentrationen (10 - 0 ng/ml) beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden durch Behandlung mit 0,1 Gew.-% Gelatine in PBS (PBS/Gelatine) blockiert. Anschließend werden die beschichteten Vertiefungen mit anti-pKe#122-1 IgG (1 µg/ml) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Fig. 6.A, geschlossene Kreise). Der Kontrollansatz erfolgt mit Kaninchen Normal-IgG in gleichen Konzentrationen (siehe Fig. 6.A, offene Kreise). Nach einem Waschschriff mit 0,05 Vol.-% Tween-20 in PBS (PBS/Tween) erfolgt eine Inkubation mit Peroxidase-markiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:10 000 in PBS/Tween). Nach einem weiteren Waschschriff zur Entfernung ungebundener enzymmarkierter Antikörper wird das farblose Peroxidase-Substrat Ortho-Phenylendiamin zugesetzt, welches durch die Peroxidase in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Anstelle von Ortho-Phenylendiamin sind auch andere Peroxidasesubstrate mit Farbumschlag einsetzbar. Die Quantifizierung der Farbbildung

und damit des gebundenen Antikörpers erfolgt durch Absorptionsmessung in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 490 gegen 405 nm (Ordinate). Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Fig. 6.A dargestellt. Es zeigt, daß die Farbkonzentration der Menge des an die Platte gebundenen pKe#122-Fusionsproteins proportional ist. Daraus folgt, daß bei Einsatz von Proben bekannter Antigenkonzentrationen, sog. Standards, durch Vergleich die Quantifizierung einer unbekannten Antigenmenge möglich ist.

Zur Quantifizierung des pKe#122-Proteins in komplexen Lösungen wird die Durchführung eines Sandwich-ELISA (Fig. 6.B) bevorzugt. Hierzu wird eine Mikrotiterplatte mit einem gegen pKe#122 gerichteten Antikörper (z.B. Kaninchen anti-pKe#122/GST-Fusionsprotein, 1 µg/Vertiefung) beschichtet. Dann werden die noch verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen der Mikrotiterplatte mit PBS/Gelatine blockiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen des pKe#122/GST-Proteins (10 - 0 ng/ml) in Ansatz gebracht. Nach einem Waschschrift mit PBS/Tween wird die Platte mit einem zweiten Peroxidase-markierten anti-pKe#122-Antikörper (z.B. peroxidase-markiertem Kaninchen anti-pKe#122-1 (Peptid)-Antikörper) inkubiert (z.B. eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur). "Peroxidase" steht hier stellvertretend für praktisch jede beliebige Markierung des Antikörpers, z.B. mit Enzymen, Fluoreszenzmolekülen oder Lumineszenzmolekülen. Nach einem weiteren Waschschrift zur Entfernung ungebundener enzymmarkierter Antikörper wird das farblose Peroxidase-Substrat Ortho-Phenylendiamin zugesetzt, welches durch die Peroxidase-Aktivität in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Quantifizierung der Farbbildung erfolgt durch Absorptionsmessung in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 490 gegen 405 nm (Ordinate). Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Fig. 6.B dargestellt. Es zeigt, daß die Farbkonzentration der Menge des an die Platte gebundenen pKe#122 proportional ist. Durch dieses Testverfahren ist folglich eine Quantifizierung der unbekannten Menge des pKe#122 in einer Probe möglich. Dabei steht die Substanz Ortho-Phenylendiamin hier stellvertretend für jedes beliebige Peroxidase-Substrat, das infolge der Peroxidase-Aktivität seine Farbe nachweisbar ändert.

Anstelle des hier beispielhaft verwendeten polyklonalen Antikörpers "anti-pKe#122-1" können ebensogut monoklonale Antikörper, die gegen das Protein pKe#122 gerichtet sind, eingesetzt werden, und zwar sowohl im einfachen ELISA (= Enzyme linked immunosorbent assay) als auch im Sandwich-ELISA.

#### **Beispiel 4: Nachweis pKe#122-spezifischer mRNA in Zellen mittels reverser**

##### **Polymerasekettenreaktion**

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde pKe#122-spezifische RNA in Zellen von Keratinozytensheets (NHEK) nach Dispasebehandlung und in HaCaT-Zellen nachgewiesen. Hierfür wurde RNA aus Zellen von Keratinozytensheets (NHEK) nach Dispasebehandlung und unterschiedlich langer weiterer Inkubationszeiten und aus HaCaT-Zellen jeweils mit Standardmethoden (Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode, siehe auch Beispiel 1A ) isoliert und in cDNA nach Standardmethoden umgeschrieben. Diese cDNA wurde einer PCR unterzogen, bei der aus der pKe#122-spezifischen cDNA ein Teilfragment von  $\approx 350$  kb amplifiziert wurde. Als Primer-Paar wurde eine Kombination aus den Primern "pKe#122-forward 3" (tgagcaggcgctgggtatcatgcag) und "pKe#122-reverse 2" (tcaccgggaacaagaagggccacct) eingesetzt. Es wurden 10 ng cDNA mit je 10  $\mu$ M Primer zusammen mit einem Gemisch aus hitzestabiler DNA-Polymerase, ATP, TTP, GTP, CTP und Polymerasepuffer (vgl. z.B.: *Current protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons, Inc, Suppl. 37, Chapter 15), hier im Beispiel in Form des im Handel gebrauchsfertig erhältlichen "PCR-Master-Mix" der Firma Clontech, in Ansatz gebracht. Zusätzlich wurden folgende Kontrolluntersuchungen durchgeführt: 1. der vorstehend beschriebene Ansatz mit dem Plasmid pUEX-1/pKe#122 anstelle der cDNA, 2. die Kit-interne Positivkontrolle, 3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz ohne Zusatz von cDNA (Negativkontrolle 1), 4. der vorstehend beschriebene Ansatz mit cDNA aus Zellen von Keratinozytensheets (NHEK) 2 Stunden nach Dispasebehandlung, ohne Zusatz von Primern (Negativkontrolle 2). Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Fig. 7 zeigt das Ergebnis dieser Auftrennung. Es gilt: Spur 1 = Molekulargewichts-Marker, Spur 2 = NHEK T0, Spur 3 = NHEK T2,

Spur 4 = NHEK T4, Spur 5 = NHEK T8, Spur 6 = HaCaT, Spur 7 = frei, Spur 8 = Positivkontrolle (pUEX-1; mit pKe#122 als Insert), Spur 9 = Negativkontrolle (Ansatz mit cDNA ohne Primer), Spur 10 = Kit-spezifische Positivkontrolle zur Funktionskontrolle der PCR, Spur 11 = Negativkontrolle (Ansatz mit Primer ohne cDNA), Spur 12 = Molekulargewichts-Marker. Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von  $\approx 350$  kb wurde in den Spuren 3, 4, 5, 6 und 8 nachgewiesen, das heißt: pKe#122-spezifische mRNA wurde in Zellen von Keratinozytensheets zum Zeitpunkt 2 (T2), 4 (T4) und 8 (T8) Stunden nach dispase-induzierter Ablösung und ebenso in HaCaT-Zellen nachgewiesen.

Diese Technik ermöglicht den Nachweis der pKe#122-Expression auch in den Fällen, in denen der Nachweis des pKe#122-Proteins aufgrund zu niedrigen Expressionsspiegels mit immunhistologischen Methoden, dem ELISA-, Dotblot- oder Westernblot-Verfahren nicht gelingt.

#### **Beispiel 5: Herstellung von Vektormolekülen mit der Fähigkeit zur Expression des Proteins pKe#122 in prokaryontischen bzw. eukaryontischen Zellen**

Zur Herstellung bzw. Expression des rekombinanten pKe#122-Proteins wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurden zwei pKe#122-Gluthathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine, pKe#122/GST-I und pKe#122/GST-II, (Vektor pGEX; siehe Fig. 8) zu dem Zweck der Expression in Bakterien (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) hergestellt. Zum anderen wurde ein pKe#122-FLAG-Fusionsprotein (Vektor pBK-CMV; siehe Fig. 9) zu dem Zweck der Expression in eukaryontischen Zellen (cos-Zellen) hergestellt.

Die pKe#122-Gluthathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteine wurden in *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) durch IPTG-Induktion zur Expression gebracht. Nach der Induktion wurde das bakterielle Lysat im Westernblot mit anti-GST-Antikörpern untersucht, und zwar im Vergleich zu pKe#122-Gluthathion-S-Transferase (GST)-Vektor tragendem, nicht-induziertem Bakterienlysate sowie zu Lysat von Bakterien, die ausschließlich GST

exprimierten. Das Produkt dieses Westernblots ist in Fig. 10.A abgebildet: Spur (a) zeigt die Kontroll-Transfektante (GST ohne Insert) vor IPTG-Induktion, Spur (b) zeigt die Kontroll-Transfektante (GST ohne Insert) nach IPTG-Induktion, Spur (c) zeigt pKe#122/GST-I vor IPTG-Induktion, Spur (d) zeigt pKe#122/GST-I nach IPTG-Induktion, Spur (e) zeigt pKe#122/GST-II vor IPTG-Induktion, und Spur (f) zeigt pKe#122/GST-II nach IPTG-Induktion.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, war ein Gemisch unterschiedlich großer GST-positiver Banden nachweisbar und zwar ausschließlich nach IPTG-Induktion. Die höchstmolekulare Bande hatte ein Molekulargewicht von ca. 100 kD (Fraktion 85), die niedrigstmolekulare Bande von ca. 26 kD, was dem Molekulargewicht des reinen GST-Proteins entspricht. Die genannten Daten weisen darauf hin, daß es in *E. coli* zu einem Abbau des rekombinanten pKe#122-GST-Fusionsproteins kommt. Die exprimierten Fusionsproteine (Spur d) lagen als unlösliche Proteinaggregate in den sog. "inclusion bodies" vor, weshalb eine Aufreinigung mittels Prep-Cell durchgeführt wurde. Die Fraktionen dieser PrepCell-Reinigung wurden dann mittels Standardverfahren elektrophoretisch aufgetrennt und mittels des bereits oben beschriebenen Immuno-Blot Verfahrens mit anti-GST-Antikörpern analysiert. Das Produkt dieses Aufreinigungsverfahrens ist in Fig. 10 B abgebildet. Die Aufreinigung ergab ein Gemisch unterschiedlich großer GST-Fusionsproteine. Die stärkste Bande, d.h. die Mehrzahl der GST-Fusionsproteine, wies ein apparentes Molekulargewichtsmarker von 65 kD auf. Das erlaubt den Schluß, daß das 65 kD pKe#122-GST-Fusionsprotein aus dem GST-Protein und einem ca. 40 kD großen Fragment des Proteins pKe#122 besteht. Das 65 kD pKe#122/GST-Fusionsprotein wurde zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums in Kaninchen herangezogen. Die Herstellung und Charakterisierung der Antikörper erfolgte wie in Beispiel 2 für die anti-Peptid-Antikörper beschrieben

Die höchstmolekulare Bande hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 100 kD (vgl. Abb. 10 B, Fraktion 85). Das erlaubt den Schluß, daß das 100 kD pKe#122-GST-Fusionsprotein aus dem GST-Protein und einem ca 70-75 kD großen Fragment des

Proteins pKe#122 besteht (vgl. auch Fig. 4 und dazugehörige Beschreibung in Beispiel 2).

Im eukaryontischen System wurde der pBK-CMV-pKe#122-Vektor (Fig. 9) in sog. Cos-Zellen, d.h. in Zellen der im Stand der Technik allgemein bekannten Cos-Zelllinie, transformiert. Die Cos-Zellen wurden nach Standardverfahren durch Behandlung mit DEAE-Dextran/Chloroquin zur Aufnahme der Plasmid-DNA gebracht. Danach wurden die transformierten Zellen zwei Tage unter Standardbedingungen (37 °C und 7 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Cos-Zellen wurden lysiert und im Immuno-Blot-Verfahren analysiert unter Verwendung eines Antikörpers gegen das FLAG-Epitop bzw. des anti-Peptid-Antikörpers anti-pKe#122-1 IgG. Fig. 11 zeigt das Produkt des Immuno-Blots: Spur a zeigt die nichttransfizierten Cos-Zellen, Spur b zeigt ein FLAG-Kontrollprotein und Spur c zeigt mit pKe#122-FLAG Vektorkonstrukt transfizierte Cos-Zellen. Die Spur c weist eine Bande mit einem ungefähren Molekulargewicht von 80 kD auf, die von dem anti-FLAG-Antikörper angefärbt wurde. Spur b zeigt ein FLAG-markiertes Kontrollprotein, das die Funktionalität des anti-FLAG-Antikörpers demonstriert.

#### **Beispiel 6: Beeinflussung von Keratinozyten durch pKe#122-spezifische Antisense-Oligonukleotide**

Antisense-Nukleotide werden von Zellen, auch Keratinozyten, aufgenommen (vgl. G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 24, C1115-C1119) und binden an die in der Zelle vorliegende mRNA und hemmen deren Translation und damit die Expression (vgl. Y.-S. Lee, et al. 1997: *Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C $\alpha$  in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes*, Molecular Carcinogenesis 18, S. 44-53). Geeignete Antisense-Oligonukleotide wurden anhand der pKe#122-spezifischen Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:1 bzw. SEQ ID NO:4) hergestellt. Sie wurden mit geeignetem Puffermedium (sog. "Oligopuffer") auf eine Konzentration von 100  $\mu$ M eingestellt. HaCaT-Zellen wurden bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Die Zellen wurden



abtrypsiniert (10 Minuten 0,2 % EDTA, 5 - 10 Minuten 0,1 % Trypsin) und auf eine Konzentration von 25 000 Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer 96-well-Platte wurden 100 µl Zellsuspension (entspricht 2 500 Zellen) einpipettiert. Die Zellen wurden 1 Stunde inkubiert, danach erfolgte die Zugabe des Antisense-Oligonukleotids (2 µl einer 100 µM-Lösung) und eine weitere Inkubation von 24-48 Stunden. Als Negativkontrolle dienten Zellansätze, denen Oligonukleotid mit der gleichen Basenverteilung aber zufällig ausgewählter Sequenz zugegeben wurden.

Die solcherart behandelten Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroskops hinsichtlich phänotypischer Veränderungen in den Zellen untersucht. Das Ergebnis der mikroskopischen Analyse ist in Fig. 12 und Fig. 13 dargestellt: Fig. 12 a zeigt subkonfluente HaCaT-Kulturen, die mit pKe#122-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden sind, Fig. 12 b zeigt subkonfluente HaCaT-Kulturen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden sind, Fig. 13 a zeigt konfluente HaCaT-Kulturen, die mit pKe#122-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden sind, Fig. 13 b zeigt konfluente HaCaT-Kulturen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden sind, und Fig. 13 c zeigt einen Detailausschnitt aus Fig. 13 a.

Die mikroskopischen Untersuchungsergebnisse demonstrieren, daß im Vergleich zu Kontroll-Oligonukleotiden die Anzahl der Zellen in den mit dem spezifischen Antisense-Oligonukleotid behandelten Kulturen deutlich reduziert ist. Das läßt auf eine durch das antisense-Oligonukleotid verursachte Verminderung der zellulären Proliferation schließen. Nach Erreichen der Konfluenz fanden sich in den mit antisense-Oligonukleotiden behandelten HaCaT-Kulturen stark vergrößerte Zellen, die in den mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelten Kulturen nicht zu finden waren. Diese großen Zellen entsprechen in ihrer Morphologie differenzierten Keratinozyten. Der Befund läßt darauf schließen, daß mit pKe#122-spezifischen antisense-Oligonukleotiden behandelte Zellen eine vermehrte Tendenz zur Differenzierung aufweisen.

Zusammengefaßt führt die Behandlung mit pKe#122-spezifischen Oligonukleotiden zu einer deutlichen Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung.

A n s p r ü c h e

## 1. Isoliertes Polypeptid,

das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist, und

das die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:3 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion aus einer dieser beiden Aminosäuresequenzen entstandenes Allel oder Derivat aufweist.

## 2. Isolierte Nukleinsäure

die ein Protein codiert,

das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist,

die entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellte Nukleotidsequenz

oder die zu einer dieser beiden komplementäre Nukleotidsequenz

oder eine Teilsequenz einer dieser beiden dargestellten oder komplementären Nukleotidsequenzen

oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist.

## 3. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,

daß diese Nukleinsäure aus einer natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Quelle gewonnen ist.

4. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine cDNA ist.
5. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure ein Sense- oder Antisense-Oligonukleotid ist, das mindestens 6, vorzugsweise 8 bis 25 Nukleotide umfaßt und mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellten Nukleotidsequenz oder Teilsequenzen davon hybridisiert.
6. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine Splice-Variante ist, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellten Nukleotidsequenz hybridisiert.
7. Isoliertes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert, welche
  - entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellte Nukleotidsequenz
  - oder die zu einer dieser beiden komplementäre Nukleotidsequenz
  - oder eine Teilsequenz einer dieser beiden dargestellten oder komplementären Nukleotidsequenzen
  - oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser vorgenannten Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist.

8. Rekombinantes DNS-Vektormolekül, das eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 umfaßt, und das die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweist.
9. Rekombinantes DNS-Vektormolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Vektormolekül das Plasmid pUEX-1 oder pGEX-2T oder pBK-CMV oder pHR 2 ist.
10. Transformierte Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 enthält, welche mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in der Wirtszelle natürlicherweise oder als Folgen einer Rekombination enthalten ist, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, aufweist.
11. Transformierte Wirtszelle nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor der Zytokeratin-14-Promotor und die Wirtszelle ein Keratinozyt ist, oder daß der Promotor der CMV-Promotor und die Wirtszelle eine Cos-Zelle ist.
12. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder eines Vektormoleküls nach Anspruch 8 zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.

13. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 7 zur Herstellung eines Antikörpers gegen dieses Polypeptid und/oder damit verwandte Proteine.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis eingesetzt wird.
15. Antikörper, der spezifisch mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 7 reagiert.
16. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 15 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung der Epidermis.
17. Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz wenigstens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 7 umfaßt.
18. Verwendung eines Sense- oder Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 5 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis.

19. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 7 oder einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 zur Identifizierung von medizinisch, kosmetisch oder pharmakologisch einsetzbaren Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen/deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere als Inhibitoren oder Aktivatoren wirken.

Tabelle 1

Charakterisierung der Anti-Peptid-Antikörper. Aus den jeweiligen Seren wurde die IgG-Fraktion mittels Ammoniumsulfat-Fällung angereichert. Die jeweiligen IgG-Präparationen wurden mit dem korrespondierenden und den irrelevanten Peptiden in einem Peptid-ELISA ausgetestet. In einem weiteren Schritt wurde die IgG-Präparation auch auf dem gereinigten Fusionsprotein GST-pKe#122-1 im Immuno-Blot getestet.

IgG-Präparation	Reaktivität Im Peptid-ELISA	Reaktivität Im Immuno-Blot (mit GST-pKe#122-I)
anti-Peptid#122-1	+	+
anti-Peptid#122-2	+	-
anti-Peptid#122-3	-	n.d.
anti-Peptid#122-4	+	-

"+" = Reaktivität; "-" = keine Reaktivität; "n.d." = nicht durchgeführt; \*) siehe auch Fig. 4.

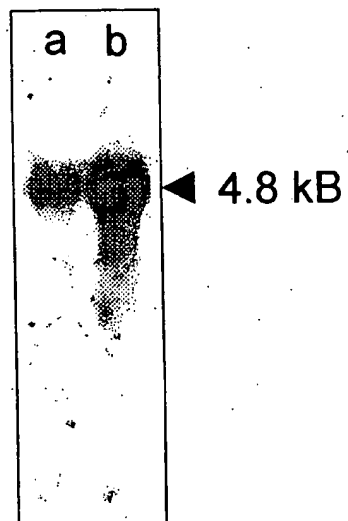


Fig.1



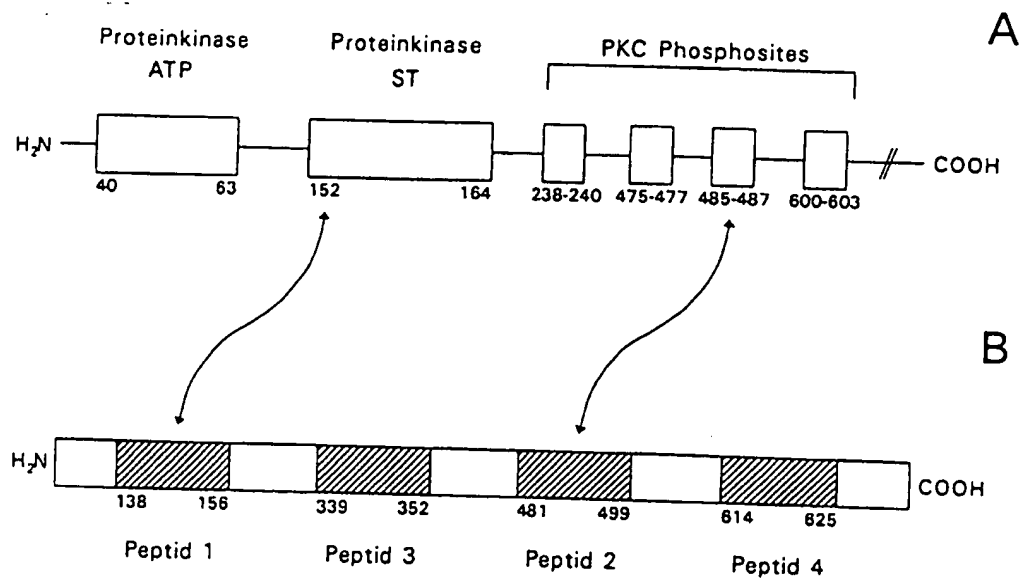


Fig. 2

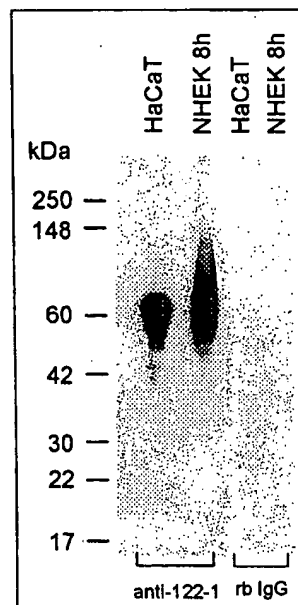


Fig.3

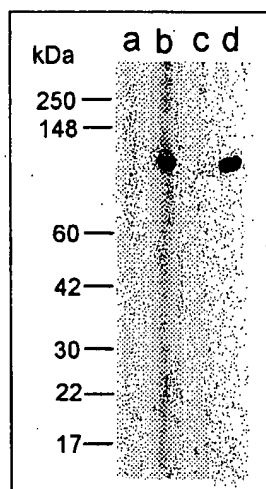


Fig.4

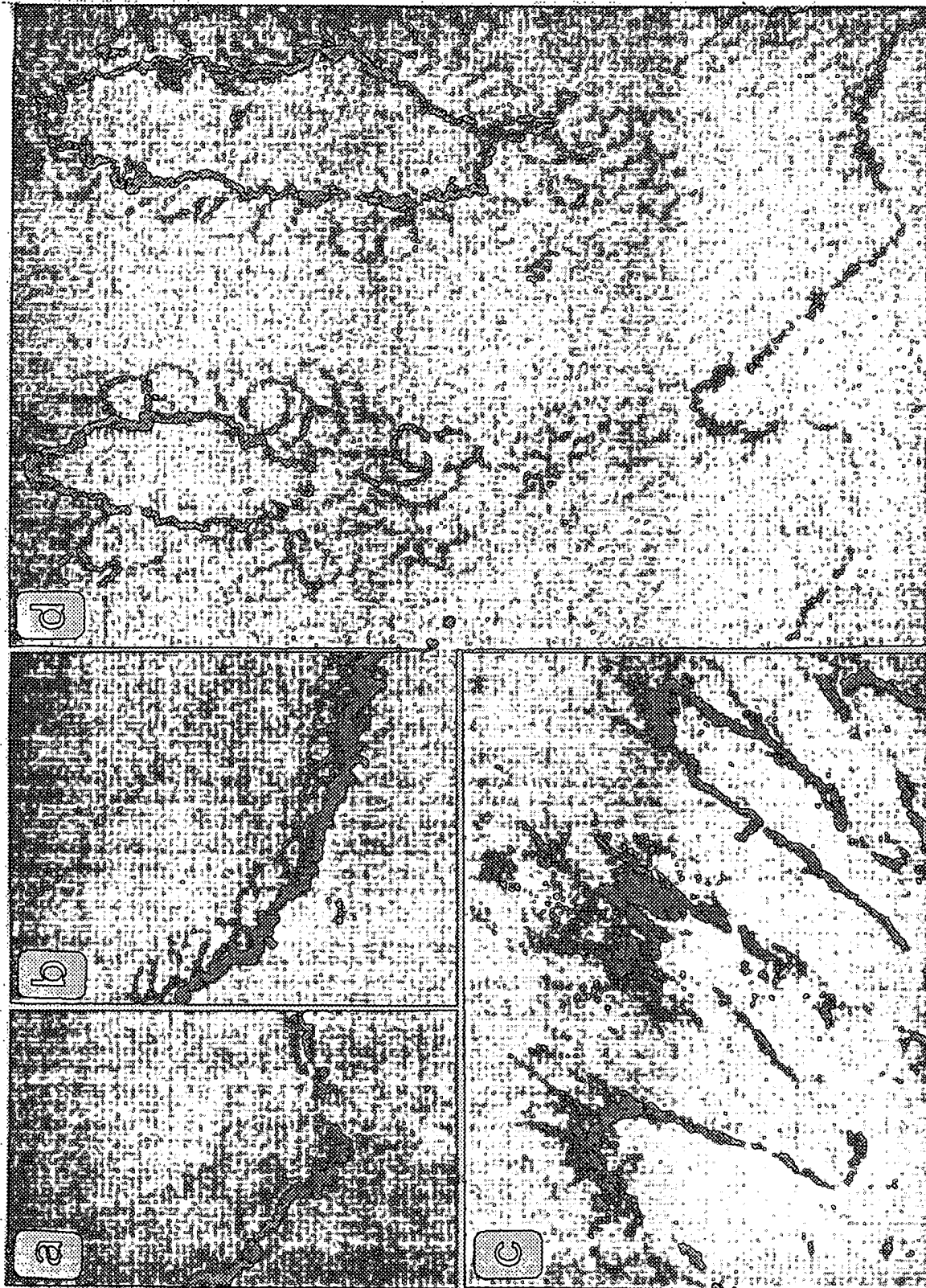


Fig. 5

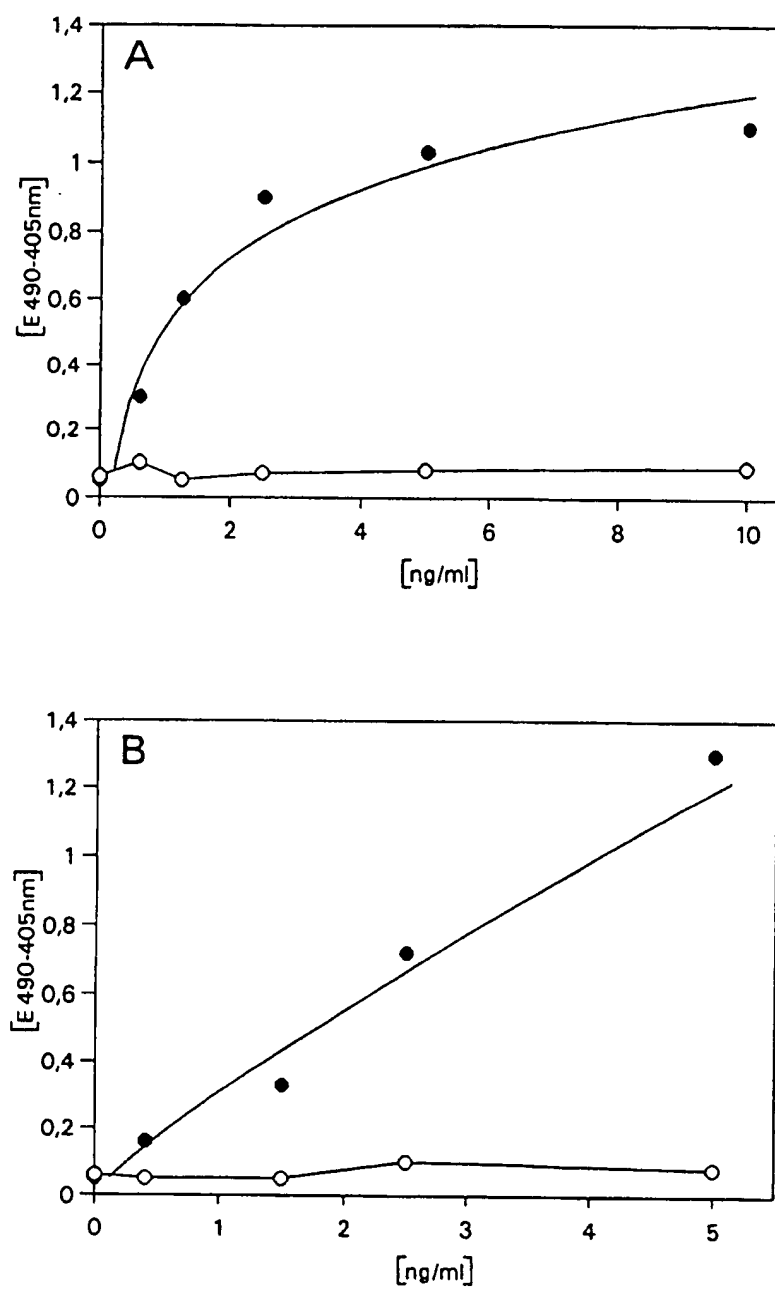


Fig. 6

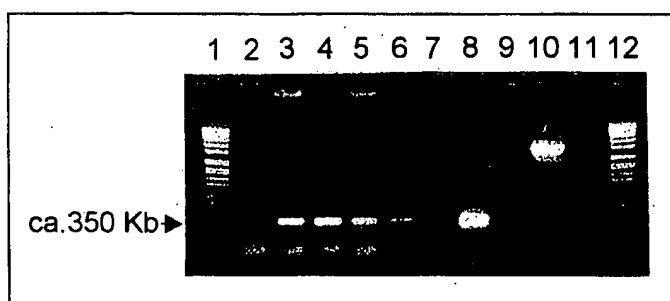


Fig.7

BamH1      pKe#122/GST-I: bp 287-2339      EcoR1  
pKe#122/GST-II: bp 287-1094

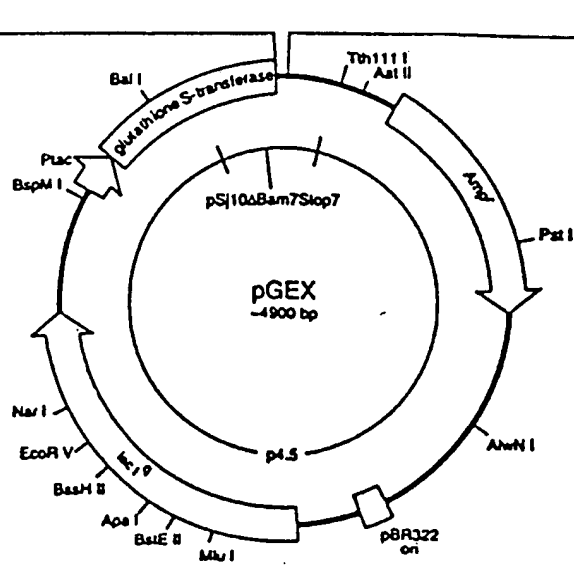


Fig.8

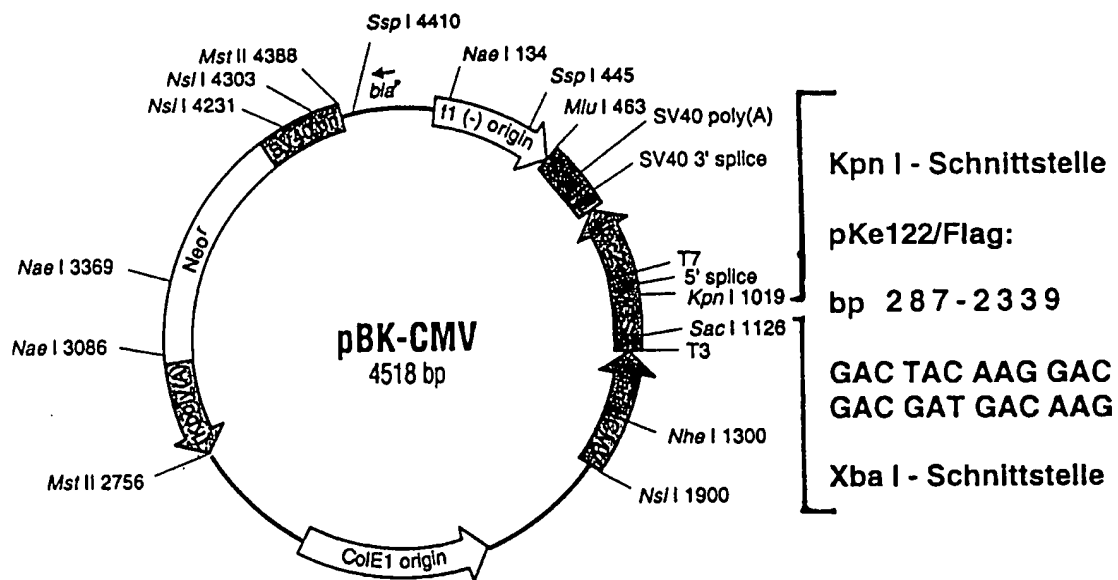


Fig. 9



11/15

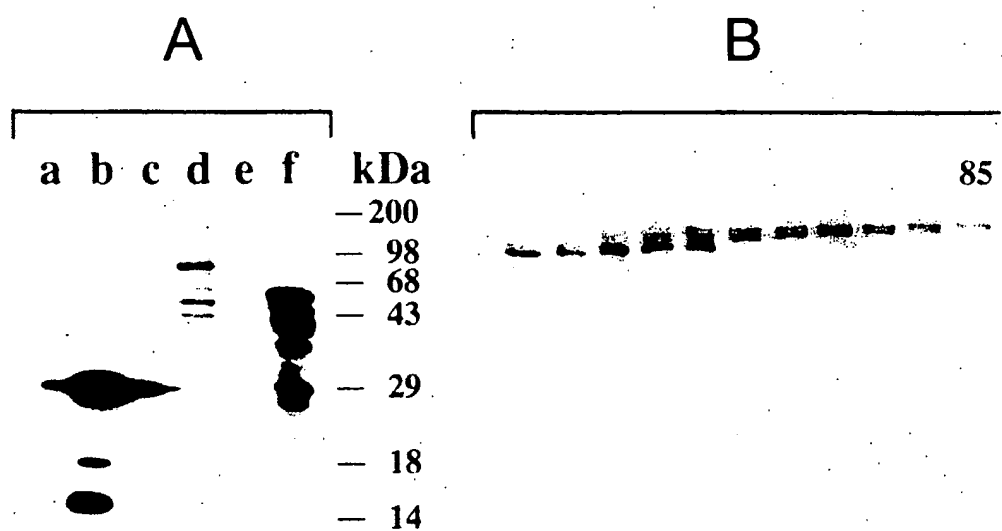


Fig.10

12/15

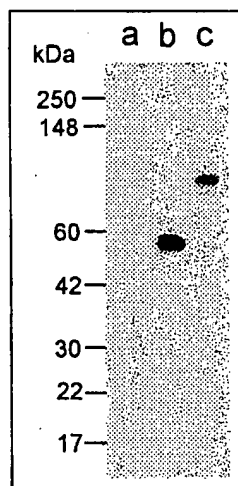


Fig.11

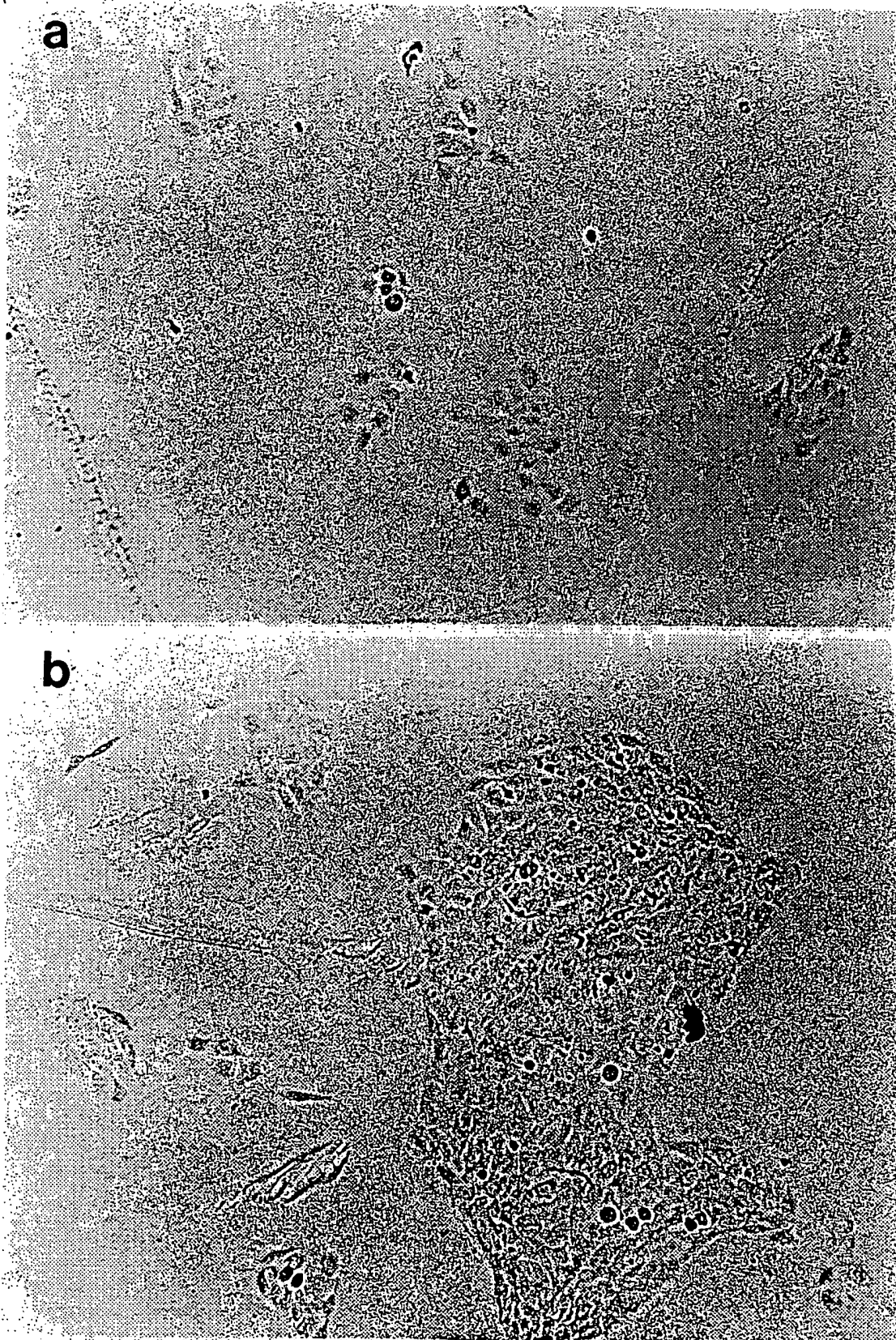


Fig. 12

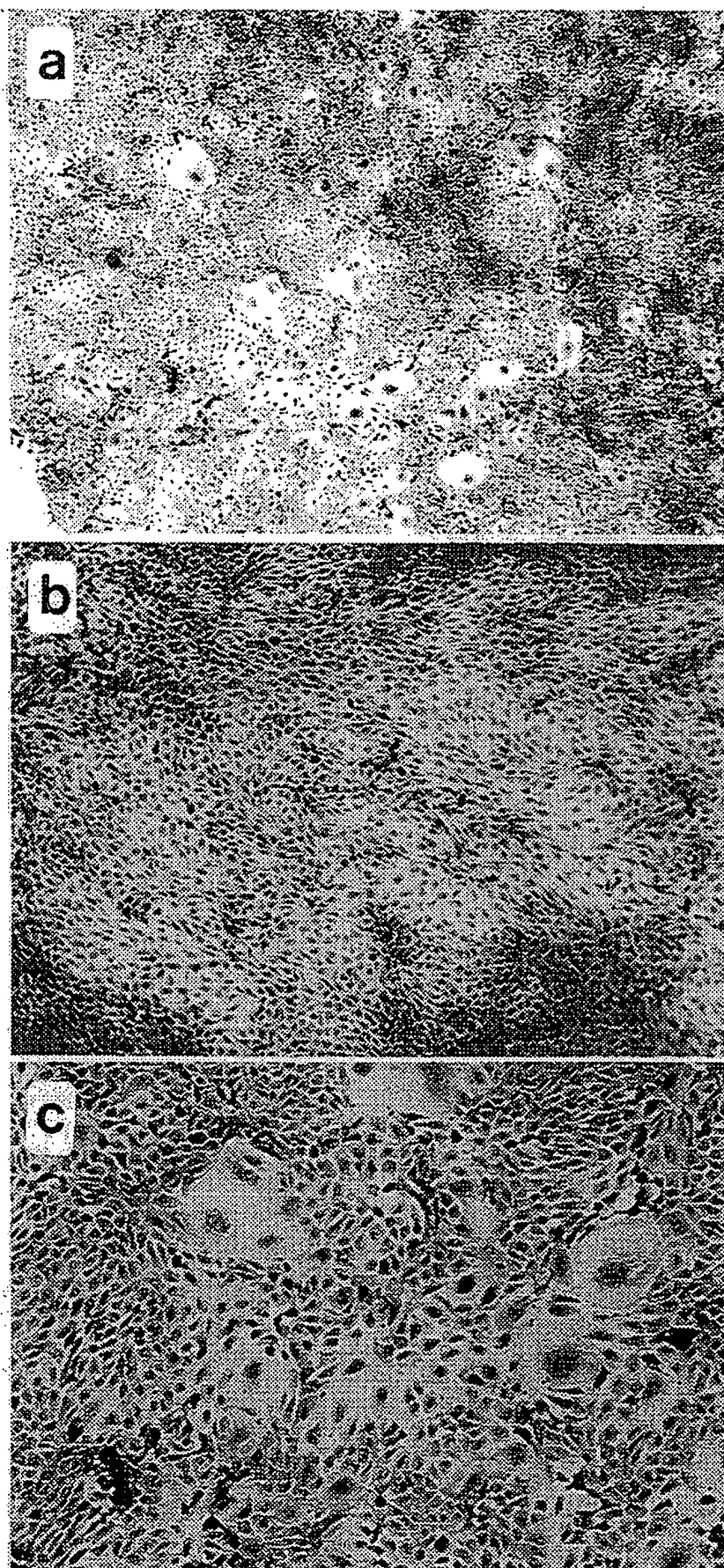


Fig. 13

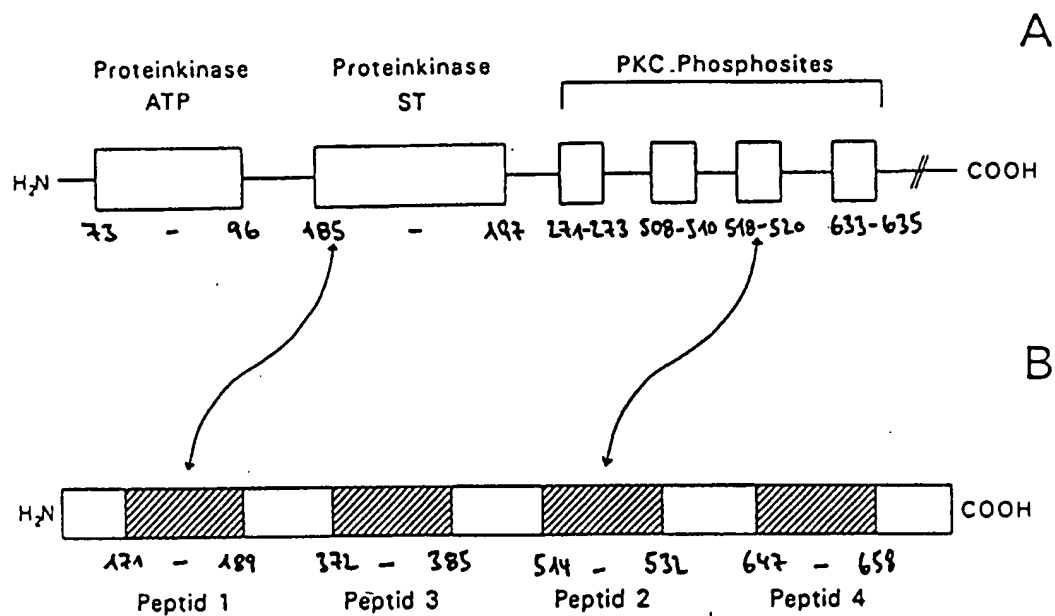


Fig.14

## SEQUENZPROTOKOLL

## ALLGEMEINE ANGABEN:

## ANMELDER:

NAME: Dr. Michael Kramer  
STRASSE: Bergstraße 85  
ORT: Pfungstadt  
BUNDESLAND: Hessen  
LAND: Deutschland  
POSTLEITZAHL: 64319

## VERTRETER:

NAME: Dr. Ulrike Rudolph  
STRASSE: In der Schanz 10  
ORT: Schriesheim  
BUNDESLAND: Baden-Württemberg  
LAND: Deutschland  
POSTLEITZAHL: 69198  
VERTRETERNUMMER: 246 263  
AKTENZEICHEN: km-1/pct

## TELEKOMMUNIKATION:

TELEFON: 06203-61348  
TELEFAX: 06203-64196

## BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

**Regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten**

ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette  
COMPUTER: IBM-kompatibler PC  
BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS  
SOFTWARE: Microsoft WORD für Windows 6.0

**ANGABEN ZU SEQ ID NO 1 :****SEQUENZCHARAKTERISTIKA:**

LÄNGE:	2533 Basenpaare
ART:	Desoxyribonukleinsäure
TOPOLOGIE:	linear

ART DES MOLEKÜLS:	cDNA
-------------------	------

HYPOTHETISCH:	nein
---------------	------

ANTI-SENSE:	nein
-------------	------

**URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

ORGANISMUS:	Homo sapiens
STAMM:	kaukasisch
ENTWICKLUNGSSTADIUM:	adult
ZELLTYP:	epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:	cDNA aus Keratinozyten
------------------------	------------------------

**MERKMAL:**

NAME/SCHLÜSSEL:	kodierende Sequenz für regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten
-----------------	--

LAGE:	von 1 bis 2533
ERMITTLUNGSMETHODE:	cDNA-Sequenzierung

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 1:

```
1   GGCACCCAGG TGCGCGCGGA GCCATGGTTA TCATGTCGGA GTTCAGCGCG
51  GACCCCGCGG GCCAGAGTCA GGGCCAGCAG AAGCCCCCTCC GGGTGGGTTT
101 TTACGACATC GAGCGGACCC TGGGCAAAGG CAACTTCGCG GTGGTGAAGC
151 TGGCGCGGCA TCGAGTCACC AAAACGCAGG TTGCAATAAA AATAATTGAT
201 AAAACACGAT TAGATTCAAG CAATTTGGAG AAAATCTATC GTGAGGTTCA
251 GCTGATGAAG CTTCTGAACC ATCCACACAT CATAAAGCTT TACCAGGTTA
301 TGGAAACAAA GGACATGCTT TACATCGTCA CTGAATTTGC TAAAAATGGA
351 GAAATGTTTG ATTATTTGAC TTCCAACGGG CACCTGAGTG AGAACGAGGC
401 GCGGAAGAAG TTCTGGCAAA TCCTGTCGGC CGTGGAGTAC TGTCACGACC
451 ATCACATCGT CCACCGGGAC CTCAAGACCG AGAACCTCCT GCTGGATGGC
501 AACATGGACA TCAAGCTGGC AGATTTTGGA TTTGGGAATT TCTACAAGTC
551 AGGAGAGCCT CTGTCCACGT GGTGTGGGAG CCCCCGTAT GCCGCCCGG
601 AAGTCTTTGA GGGGAAGGAG TATGAAGGCC CCCAGCTGGA CATCTGGAGC
651 CTGGGCGTGG TGCTGTACGT CCTGGTCTGC GGTTCCTCCT CCTTCGATGG
701 GCCTAACCTG CCGACGCTGA GACAGCGGGT GCTGGAGGGC CGCTTCCGCA
751 TCCCCTTCTT CATGTCTCAA GACTGTGAGA GCCTGATCCG CCGCATGCTG
801 GTGGTGGACC CCGCCAGGCG CATCACCATC GCCCAGATCC GGCAGCACC
851 GTGGATGCGG GCTGAGCCCT GCTTGCCGGG ACCCGCTGC CCCGCCCTCT
901 CCGCACACAG CTACACCTCC AACCTGGGCG ACTACGATGA GCAGGCGCTG
951 GGTATCATGC AGACCCTGGG CGTGGACCGG CAGAGGACGG TGGAGTCACT
1001 GCAAAACAGC AGCTATAACC ACTTTGCTGC CATTTATTAC CTCCTCCTTG
1051 AGCGGCTCAA GGAGTATCGG AATGCCCAGT GCGCCCGCCC CGGGCCTGCC
1101 AGGCAGCCGC GGCCTCGGAG CTCGGACCTC AGTGGTTTGG AGGTGCCTCA
1151 GGAAGGTCTT TCCACCGACC CTTTCCGACC TGCCTTGCTG TGCCCGCAGC
1201 CGCAGACCTT GGTGCAGTCC GTCCTCCAGG CCGAGATGGA CTGTGAGCTC
1251 CAGAGCTCGC TGCAGTGGCC CTTGTTCTTC CCGGTGGATG CCAGCTGCAG
1301 CGGAGTGTTT CCGCCCCGGC CCGTGTCCCC AAGCAGCCTG CTGGACACAG
1351 CCATCAGTGA GGAGGCCAGG CAGGGGCCGG GCCTAGAGGA GGAGCAGGAC
1401 ACGCAGGAGT CCCTGCCCAG CAGCACGGGC CGGAGGCACA CCCTGGCCGA
1451 GGTCTCCACC CGCCTCTCCC CACTACCGC GCCATGTATA GTCGTCTCCC
1501 CCTCCACCAC GGCAAGTCCT GCAGAGGGA CCAGCTCTGA CAGTTGTCTG
1551 ACCTTCTCTG CGAGCAAAAG CCCC CGGGG CTGAGTGGCA CCCC GGCCAC
1601 TCAGGGGCTG CTGGGCGCCT GCTCCCCGGT CAGGCTGGCC TCGCCCTTCC
1651 TGGGGTCGCA GTCCGCCACC CCAGTGCTGC AGGCTCAGGG GGGCTGGGA
1701 GGAGCTGTTT TGCTCCCTGT CAGTTCCAG GAGGGACGGC GGGCGTCGGA
1751 CACCTCACTG ACTCAAGGGC TGAAGGCCTT TCGGCAGCAG CTGAGGAAGA
1801 CCACGCGGAC CAAAGGGTTT CTGGGACTGA ACAAATCAA GGGGCTGGCT
1851 CGCCAGGTGT GCCAGGTCCC TGCCAGCCGG GCCAGCAGGG GCGGCCTGAG
1901 CCCCTTCCAC GCCCCTGCAC AGAGCCCAGG CCTGCACGGC GGCGCAGCCG
1951 GCAGCCGGGA GGGCTGGAGC CTGCTGGAGG AGGTGCTAGA GCAGCAGAGG
2001 CTGCTCCAGT TACAGCACCA CCCGGCCGCT GCACCCGGCT GCTCCAGGC
2051 CCCCAGCCG GCCCCTGCCC CGTTTGATGAT CGCCCCCTGT GATGGCCCTG
2101 GGGCTGCCCC GCTCCCCAGC ACCCTCCTCA CGTCGGGGCT CCCGCTGCTG
2151 CCGCCCCCAC TCCTGCAGAC CGGCGGTCC CCCGTGGCCT CAGCGGCGCA
2201 GCTCCTGGAC ACACACCTGC ACATTGGCAC CGGCCCCACC GCCCTCCCCG
2251 CTGTGCCCCC ACCACGCCTG GCCAGGCTGG CCCCAGGTTG TGAGCCCCTG
2301 GGGCTGCTGC AGGGGGACTG TGAGATGGAG GACCTGATGC CCTGCTCCCT
2351 AGGCACGTTT GTCCTGGTGC AGTGAGGGCA GCCCTGCATC CTGGCACGGA
2401 CACTGACTCT TACAGCAATA ACTTCAGAGG AGGTGAAGAC ATCTGGCCTC
2451 AAAGCCAAGA ACTTTCTAGA AGCGAAATAA GCAATACGTT AGGTGTTTGG
2501 GCGAAAAAAA AAAAAA AAAA AAAA
```



**ANGABEN ZU SEQ ID NO 2:****SEQUENZCHARAKTERISTIKA:**

LÄNGE:

790 Aminosäuren

ART:

Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS:

Protein

**URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

ORGANISMUS:

Homo sapiens

STAMM:

kaukasisch

ENTWICKLUNGSSTADIUM:

adult

ZELLTYP:

epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

abgeleitet aus cDNA-Sequenz

**MERKMAL:**

NAME/SCHLÜSSEL:

kodierende Sequenz für  
regulatorisches Protein aus  
humanen Keratinozyten

LAGE:

von 1 bis 790

ERMITTLUNGSMETHODE:

Ableitung aus cDNA-Sequenz

SONSTIGE ANGABEN:

umfaßt ein Serin/Threonin-Kinase-Motiv,  
vier Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive  
und eine Kinase-Domäne mit  
ATP-Bindungsstelle

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 2 :

1	HPGARGAMVI	MSEFSADPAG	QSQGQKPLR	VGFYDIERTL	GKGNFAVVKL
51	ARHRVTKTQV	AIKIIDKTRL	DSSNLEKIYR	EVQLMKLLNH	PHIICKLYQVM
101	ETKDMLYIVT	EFAKNGEMFD	YLTSNGHLSE	NEARKKFWQI	LSAVEYCHDH
151	HIVHRDLKTE	NLLLDGNMDI	KLADFGFGNF	YKSGEPLSTW	CGSPPYAAPE
201	VFEGKEYEGP	QLDIWSLGVV	LYVLVCGSLP	FDGPNLPTLR	QRVLEGRFRI
251	PFFMSQDCES	LIRRMLVVDP	ARRITIAQIR	QHRWMRAEPC	LPGPACPAFS
301	AHSYTSNLGD	YDEQALGIMQ	TLGVDRQRTV	ESLQNSSYNH	FAAIYYLLE
351	RLKEYRNAQC	ARPGPARQPR	PRSSDLGLE	VPQEGLSTDP	FRPALLCPQP
401	QTLVQSVLQA	EMDCELQSSL	QWPLFFPVDA	SCSGVFRPRP	VSPSSLLDTA
451	ISEEARQGPG	LEEEQDTQES	LPSSTGRRHT	LAEVSTRISP	LTAPCIVVSP
501	STTASPAEGT	SSDSCLTFSA	SKSPAGLSGT	PATQGLLGAC	SPVRLASPFL
551	GSQSATPVLQ	AQGGLGGAVL	LPVSFQEGRR	ASDTSLTQGL	KAFRQQLRKT
601	TRTKGFLGLN	KIKGLARQVC	QVPASRASRG	GLSPFHAPAQ	SPGLHGGAAG
651	SREGWSLLEE	VLEQQRLLQL	QHHPAAAPGC	SQAPQPAPAP	FVIAPCDGPG
701	AAPLPSTLLT	SGLPLLPPPL	LQTGASPVAS	AAQLLDTHLH	IGTGPTALPA
751	VPPPRLARLA	PGCEPLGLLQ	GDCEMEDLMP	CSLGTFFVLVQ	

**ANGABEN ZU SEQ ID NO 3 :****SEQUENZCHARAKTERISTIKA:**

LÄNGE: 823 Aminosäuren  
ART: Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS: Protein

**URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

ORGANISMUS: Homo sapiens  
STAMM: kaukasisch  
ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult  
ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT: abgeleitet aus cDNA-Sequenz

**MERKMAL:**

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für  
regulatorisches Protein aus  
humanen Keratinozyten

LAGE: von 1 bis 823  
ERMITTLUNGSMETHODE: Ableitung aus cDNA-Sequenz  
SONSTIGE ANGABEN: umfaßt ein Serin/Threonin-Kinase-Motiv,  
vier Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive  
und eine Kinase-Domäne mit  
ATP-Bindungsstelle

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 3 :

```
1  PEAIAAIAAIA GAVGTRAAPA AERAASWPGR SGGGGGARGA MVIMSEFSAD
51 PAGQSQQQK SLRVGFYDIE RTLKGKNFAV VKLARHRVTK TQVAIKIIDK
101 TRLDSSNLEK IYREVQLMKL LNHPHIKLY QVMETKDMLY IVTEFAKNGE
151 MFDYLTSNGH LSENEARKKF WQILSAVEYC HDHHIVHRDL KTENLLLDGN
201 MDIKLADFGF GNFYKSGEPL STWCGSPPYA APEVFEGKEY EGPQLDIWSL
251 GVVLYVLVCG SLPFDGPNLP TLRQRVLEGR FRIPFFMSQD CESLIRRLV
301 VDPARRITIA QIRQHRWMRA EPCLPGPACP AFSAHSYTSN LGDYDEQALG
351 IMQTLGVDRQ RTVESLQNSS YNHFAAIYYL LLERLKEYRN AQCARPGPAR
401 QPRPRSSDLS GLEVPQEGLS TDPFRPALLC PQPQTLVQSV LQAEMDCELQ
451 SSLQWPLFFP VDASCSGVFR PRPVSPSSLL DTAISEEARQ GPGLEEEQDT
501 QESLPSSTGR RHTLAEVSTR LSPLTAPCIV VSPSTTASPA EGTSSDSCLT
551 FSASKSPAGL SGTPATQGLL GACSPVRLAS PFLGSQSATP VLQAQGGLGG
601 AVLLPVSFQE GRRASDTSLT QGLKAFRQQL RKTTRTKGFL GLNKIKGLAR
651 QVCQVPASRA SRGGLSPFHA PAQSPGLHGG AAGSREGWSL LEEVLEQQRL
701 LQLQHHPAAA PGCSQAPQPA PAPFVIAPCD GPGAAPLPST LLTSGLPLLP
751 PPLLQTGASP VASAAQLLDT HLHIGTGPTA LPAVPPPRLA RLAPGCEPLG
801 LLQGDCEMED LMPCSLGTFV LVQ
```

**ANGABEN ZU SEQ ID NO 4 :****SEQUENZCHARAKTERISTIKA:**

LÄNGE:	2632 Basenpaare
ART:	Desoxyribonukleinsäure
TOPOLOGIE:	linear

ART DES MOLEKÜLS:	cDNA
-------------------	------

HYPOTHETISCH:	nein
---------------	------

ANTI-SENSE:	nein
-------------	------

**URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

ORGANISMUS:	Homo sapiens
STAMM:	kaukasisch
ENTWICKLUNGSSTADIUM:	adult
ZELLTYP:	epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:	cDNA aus Keratinozyten
------------------------	------------------------

**MERKMAL:**

NAME/SCHLÜSSEL:	kodierende Sequenz für regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten
-----------------	--

LAGE:	von 1 bis 2632
ERMITTLUNGSMETHODE:	cDNA-Sequenzierung

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 4 :

```
1   CCCCCGAGGC AGCAGCAGCG GCGGCGGCAG CCGGAGCAGT AGGCACCCGA
51  GCAGCGCCAG CGGCCGAGCG GCGGCTTCC TGGCCTGGGC GCTCCGGTGG
101 CGGCGGAGGT GCGCGCGGAG CCATGGTTAT CATGTCGGAG TTCAGCGCGG
151 ACCCCGCGGG CCAGAGTCAG GGCCAGCAGA AGTCCCTCCG GGTGGGTTTT
201 TACGACATCG AGCGGACCCT GGGCAAAGGC AACTTCGCGG TGGTGAAGCT
251 GGCGCGGCAT CGAGTCACCA AAACGCAGGT TGCAATAAAA ATAATTGATA
301 AAACACGATT AGATTCAAGC AATTTGGAGA AAATCTATCG TGAGGTTTCA
351 CTGATGAAGC TTCTGAACCA TCCACACATC ATAAAGCTTT ACCAGGTTAT
401 GGAAACAAAG GACATGCTTT ACATCGTCAC TGAATTTGCT AAAAATGGAG
451 AAATGTTTGA TTATTTGACT TCCAACGGGC ACCTGAGTGA GAACGAGGCG
501 CGGAAGAAGT TCTGGCAAAT CCTGTCGGCC GTGGAGTACT GTCACGACCA
551 TCACATCGTC CACCGGGACC TCAAGACCGA GAACCTCCTG CTGGATGGCA
601 ACATGGACAT CAAGCTGGCA GATTTTGGAT TTGGGAATTT CTACAAGTCA
651 GGAGAGCCTC TGTCCACGTG GTGTGGGAGC CCCCCTATG CCCCCCGGA
701 AGTCTTTGAG GGGAAGGAGT ATGAAGGCC CCAGCTGGAC ATCTGGAGCC
751 TGGGCGTGGT GCTGTACGTC CTGGTCTGCG GTTCTCTCCC CTTGATGGG
801 CCTAACCTGC CGACGCTGAG ACAGCGGGTG CTGGAGGGCC GCTTCCGCAT
851 CCCCTTCTTC ATGTCTCAAG ACTGTGAGAG CCTGATCCGC CGCATGCTGG
901 TGGTGGACCC CGCCAGGCGC ATCACCATCG CCCAGATCCG GCAGCACC GG
951 TGGATGCGGG CTGAGCCCTG CTTGCCGGA CCGCCTGCC CCGCCTTCTC
1001 CGCACACAGC TACACCTCCA ACCTGGGCGA CTACGATGAG CAGGCGCTGG
1051 GTATCATGCA GACCCTGGGC GTGGACCGGC AGAGGACGGT GGAGTCACTG
1101 CAAAACAGCA GCTATAACCA CTTTGCTGCC ATTTATTACC TCCTCCTTGA
1151 GCGGCTCAAG GAGTATCGGA ATGCCAGTG CGCCCGCCCC GGGCCTGCCA
1201 GGCAGCCGCG GCCTCGGAGC TCGGACCTCA GTGGTTTGGA GGTGCCTCAG
1251 GAAGGTCTTT CCACCGACCC TTTCCGACCT GCCTTGCTGT GCCCGCAGCC
1301 GCAGACCTTG GTGCAGTCCG TCCTCCAGGC CGAGATGGAC TGTGAGCTCC
1351 AGAGCTCGCT GCAGTGGCCC TTGTTCTTCC CGGTGGATGC CAGCTGCAGC
1401 GGAGTGTTCC GGCCCCGGCC CGTGTCCCA AGCAGCCTGC TGGACACAGC
1451 CATCAGTGAG GAGGCCAGGC AGGGGCCGGG CCTAGAGGAG GAGCAGGACA
1501 CGCAGGAGTC CCTGCCCAGC AGCACGGGCC GGAGGCACAC CCTGGCCGAG
1551 GTCTCCACCC GCCTCTCCCC ACTCACCGCG CCATGTATAG TCGTCTCCCC
1601 CTCCACCACG GCAAGTCCTG CAGAGGGAAC CAGCTCTGAC AGTTGTCTGA
1651 CCTTCTCTGC GAGCAAAGC CCCGCGGGGC TCAGTGGCAC CCCGGCCACT
1701 CAGGGGCTGC TGGGCGCCTG CTCCCCGGTC AGGCTGGCCT CGCCCTTCCT
1751 GGGGTGCGAG TCCGCCACCC CAGTGCTGCA GGCTCAGGGG GGCTTGGGAG
1801 GAGCTGTTCT GCTCCCTGTC AGCTTCCAGG AGGGACGGCG GGCCTCGGAC
1851 ACCTCACTGA CTAAGGGCT GAAGGCCTTT CGGCAGCAGC TGAGGAAGAC
1901 CACGCGGACC AAAGGGTTTC TGGGACTGAA CAAAATCAAG GGGCTGGCTC
1951 GCCAGGTGTG CCAGGTCCTT GCCAGCCGGG CCAGCAGGGG CGGCCTGAGC
2001 CCCTTCCACG CCCCTGCACA GAGCCCAGGC CTGCACGGCG GCGCAGCCGG
2051 CAGCCGGGAG GGCTGGAGCC TGCTGGAGGA GGTGCTAGAG CAGCAGAGGC
2101 TGCTCCAGTT ACAGCACCAC CCGGCCGCTG CACCCGGCTG CTCCCAGGCC
2151 CCCAGCCGG CCCCTGCCCC GTTTGTGATC GCCCCCTGTG ATGGCCCTGG
2201 GGCTGCCCCG CTCCCAGCA CCTCCTCAC GTCGGGGCTC CCGCTGCTGC
2251 CGCCCCACT CCTGCAGACC GCGCGTCCC CGGTGGCCTC AGCGGCGCAG
2301 CTCCTGGACA CACACCTGCA CATTGGCACC GGCCCCACCG CCTCCCCGC
2351 TGTGCCCCCA CCACGCCTG CCAGGCTGGC CCCAGGTTGT GAGCCCCCTG
2401 GGCTGCTGCA GGGGACTGT GAGATGGAG ACCTGATGCC CTGCTCCCTA
2451 GGCACGTTTG TCCTGGTGCA GTGAGGGCAG CCCTGCATCC TGGCACGGAC
2501 ACTGACTCTT ACAGCAATAA CTTAGAGGA GGTGAAGACA TCTGGCCTCA
2551 AAGCCAAGAA CTTTCTAGAA GCGAAATAAG CAATACGTTA GGTGTTTTGG
2601 CGAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AA
```